

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y PRODUCCIÓN ANIMAL

**CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES EN LOS
ESPERMATOZOIDES DE GANADO VACUNO DESPUÉS DE SER
SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS**

*La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real.
Es un viaje, nunca una llegada (Karl Popper, 1902-1994)*

Trabajo presentado para aspirar al Grado de Doctor por la USC
Rubén Gómez Martín

Lugo, septiembre de 2013

Ignacio Salazar Beloqui, catedrático de la Universidad de Santiago de Compostela con destino en la Facultad de Veterinaria de Lugo, departamento de Anatomía y Producción Animal, y Alejandro Fernández Fernández, director de Xenética Fontao,

INFORMAN: que el trabajo titulado **“Cambios morfológicos y funcionales en los espermatozoides de ganado vacuno después de ser sometidos a diferentes tratamientos”**, del que es autor el alumno de tercer ciclo Rubén Gómez Martín ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Revisado el presente estudio quedamos conformes con su presentación para ser juzgado.

Lugo, septiembre de 2013

Ignacio Salazar

Alejandro Fernández

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta memoria no es el resultado de un trabajo individual, sino del esfuerzo compartido de muchas personas. Es por esta razón que quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a toda la gente, que con su ayuda, permitió que este estudio se llevase a cabo.

En primer lugar a mis directores de tesis, el profesor Ignacio Salazar Beloqui, catedrático del departamento de Anatomía y Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela, y el doctor Alejandro Fernández Fernández, director del Centro de Selección y Reproducción Animal Xenética Fontao. Al primero por su ayuda y por la constante supervisión científica de los trabajos. Al segundo por su completa disposición en la búsqueda de nuevos reactivos y nuevos métodos que puedan mejorar los protocolos ya existentes.

Al doctor Manuel Antonio Presedo Quindimil del departamento de Matemáticas (área de conocimiento de Estadística e Investigación Operativa) de la Universidad de la Coruña y a la profesora Nathalie C. Vandenberghe, catedrática del departamento de Anatomía y Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela, por su inestimable y desinteresada ayuda para la confección e interpretación del estudio estadístico.

A las compañeras de trabajo Maka y Luisa por su ayuda en las labores de envasado, congelación y almacenamiento de las muestras seminales.

A los compañeros de trabajo Álvaro, Ángel, Dadi, Domingo, Juan y Manuel encargados del manejo, limpieza y alimentación de los sementales, así como de la extracción de las muestras de semen.

A Rubén Francisco Vázquez, responsable del Laboratorio de Fecundación *In Vitro* de Xenética Fontao, por mostrarme los procedimientos que se emplean para manipular el semen en un laboratorio de fecundación *in vitro*, y por su ayuda en la realización de los reactivos utilizados.

Al resto de compañeros de Xenética Fontao, Héctor, Carmen, Cris, María, Susana, Clara, Chus, Mauricio, Carmen Garcia, Rocío, Paula y Sandra por los momentos compartidos en el café que han hecho el trabajo mucho más ameno.

A mi familia. A mis hermanos Maria, Jano y Fonso, y a mis padres, por su

cariño incondicional y por transmitirme el gusto por el conocimiento.

A mis abuelos. A mi abuela, allá donde esté, por ser un ejemplo de bondad, y a mi abuelo por demostrarme constantemente que hay que afrontar la vida con energía.

A todos ellos, ¡muchas gracias!



RESUMEN

En el presente trabajo, elaborado y presentado para optar al grado de doctor por la Universidad de Santiago de Compostela, se ha realizado un estudio sobre los efectos del colesterol en la criopreservación del semen del ganado vacuno. A tal efecto se han utilizado doce sementales previamente probados y estabulados en las instalaciones de la empresa Xenética Fontao S.A., ubicada en la provincia de Lugo. Cuatro de esos sementales eran de raza frisona, cuatro de raza limusina y los otros cuatro de la raza rubia gallega.

Siguiendo el procedimiento habitual que incluye las fases de recogida de material, preparación de las ciclodextrinas, procesado y dilución del semen, y posterior envasado y congelación, que se describen con detalle en el correspondiente capítulo, las dosis seminales se analizaron mediante citometría de flujo. Se programaron tres experimentos distintos para evaluar las variables de viabilidad, resistencia térmica, reacción acrosómica y fragmentación de la cromatina. Por otro lado, siguiendo una sistemática convencional y rutinaria en este caso, se recogieron datos sobre los defectos morfológicos más habituales que presentan los espermatozoides.

Los resultados obtenidos, presentados en esta memoria en tres apartados diferentes, ponen de manifiesto el efecto beneficioso del colesterol durante el proceso de la criopreservación cuando se añade al semen asociado a las ciclodextrinas. Ese efecto, que es manifiesto en cuanto a la viabilidad, fragmentación de la cromatina y reacción acrosómica, es corroborado porcentualmente por medio del pertinente análisis estadístico.

Significado de las abreviaturas empleadas en la memoria

ACRUGA, Asociación de Criadores de Rubia Gallega

ADN, ácido desoxirribonucleico

BSP, binder sperm proteins

CASA, computer assisted sperm analysis

CLC, cholesterol loaded cyclodextrin

COMP, cells outside main population

CONAFE, Confederación Asociación Frisona Española

DFI, DNA fragmentation index

DM, dichroic mirror

EDTA, etilen-diamino-tetra-acético

FEFRIGA, Asociación de Ganaderos de la Federación Frisona Gallega

FIV, fecundación in vitro

FOGGA, Fondo Gallego de Garantía Agraria

FSC, forward scatter

IA, inseminación artificial

ICAP, índice de capacidad

ICO, índice combinado

ICU, índice compuesto de ubre

IGT, índice global de tipo

IP, yoduro de propidio

IPP, índice de pies y patas

LDL, low density lipoprotein

PNA, peanut agglutinin

RCS, recuento células somáticas

ROS, reactive oxygen species

SCSA, sperm chromatin structure assay

SSC, side scatter

INDICE

1. Introducción	1
2. Material y métodos	28
2.1. Material	29
2.1.1. Material biológico	30
2.1.1.1 Datos de los sementales	35
2.1.2. Material de laboratorio	48
2.1.2.1. Equipamiento	48
2.1.2.2. Reactivos y útiles varios	50
2.2. Métodos	53
2.2.1. Recogida de muestras	53
2.2.2. Preparación ciclodextrinas	53
2.2.3. Procesado y dilución del semen	54
2.2.4. Envasado y congelación del semen	56
2.2.5. Análisis de las dosis seminales	56
2.2.5.1. Viabilidad espermática	58
2.2.5.2. Resistencia térmica	58
2.2.5.3. Fragmentación cromatina	58
2.2.5.4. Reacción acrosómica	59
2.2.6. Resumen diseño experimentos	61
2.2.7. Análisis estadístico	63

2.2.8. Análisis morfológico	63
3. Resultados	65
3.1. Introducción	66
3.2. Datos generales	67
3.3. Estudio estadístico	120
3.4. Morfología	214
4. Discusión	215
5. Conclusiones	230
6. Bibliografía	233
7. Iconografía	253





1. INTRODUCCIÓN

Una vez finalizada la licenciatura en la Facultad de Veterinaria de Lugo de la Universidad de Santiago de Compostela y después de unos años de trabajos eventuales, en el año 2007 me incorporé a la plantilla de la empresa Xenética Fontao S.A., en la sección del Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia trabajando como veterinario responsable del Laboratorio de Análisis de Semen. Mi labor principal en este laboratorio fue, y sigue siendo, la de estudiar el semen producido por los sementales del Centro y escoger solamente aquellos eyaculados que, por su buena calidad, son óptimos para elaborar las dosis seminales que luego son utilizadas en las explotaciones ganaderas.

La producción de dosis seminales en un centro como Xenética Fontao se realiza gracias a la criopreservación, denominación que se aplica al proceso de conservar viables tejidos o células, en este caso espermatozoides, a temperaturas muy bajas. Para que eso tenga lugar es necesario añadir al semen crioprotectores, sustancias que por sus propiedades otorgan al semen la capacidad de resistir temperaturas extremas, y mantener sus capacidades una vez descongelado. Los crioprotectores, junto con otras sustancias como azúcares o antibióticos, forman parte de la composición básica de todos los diluyentes que se añaden al semen para producir dosis seminales. La relación de diluyentes es extensa y se comercializan con diferentes nombres por las empresas especializadas.

Como consecuencia del trabajo que llevo a cabo en el Laboratorio de Análisis de Semen de Xenética Fontao, nos planteamos la idea de elaborar diluyentes propios para usar en el proceso de congelación del semen producido por los sementales estabulados en Xenética Fontao. La idea inicial se fue modificando de manera paulatina y finalmente condujo a centrar el interés en estudiar los efectos de la adición de colesterol en la conservación del semen de toros. Tras superar ciertas dificultades iniciales relacionadas con el protocolo de congelación se diseñaron los experimentos que se detallan pormenorizadamente en el capítulo correspondiente, que en definitiva tendrían como objetivo principal la mejora de la calidad del esperma que Xenética Fontao, como centro de referencia en el campo de la inseminación artificial (IA), ofrece al mercado.

Con el paso del tiempo se pensó que el tema pudiera tener suficiente entidad para elaborar una memoria con la cual poder aspirar a obtener el grado

de doctor en veterinaria. Gracias al apoyo de Alejandro Fernández, director de Xenética Fontao y profesor asociado en el departamento de Anatomía y Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, y de Ignacio Salazar, catedrático de universidad adscrito al mismo departamento, mi deseo se pudo hacer realidad y fruto de esa colaboración es el trabajo que ahora se presenta. Aunque, como se acaba de mencionar y es preceptivo, las especificaciones de los experimentos realizados se describen in extenso en el apartado de material y métodos, se indica ahora que el objetivo concreto de este estudio es determinar los efectos del colesterol como crioconservante del semen de ganado vacuno, en cuanto a morfología, viabilidad de los espermatozoides, fragmentación celular y reacción acrosómica. Los efectos se analizan en semen procedente de doce toros, siempre los mismos, pertenecientes a tres razas distintas, recolectado en cuatro momentos distintos del año.

Resulta evidente que el empleo del colesterol, y por lo tanto de todos los crioconservantes, surge como una necesidad para intentar mejorar las condiciones del semen en el doble proceso de congelación/descongelación. Por esa razón, la presente introducción se inicia con comentarios relativos al significado de la IA, la técnica de reproducción asistida más utilizada en la cría de animales de granja y de manera muy particular en el ganado vacuno lechero.

Hay que tener en cuenta que la productividad es la clave del crecimiento, y por ello la reproducción es la columna vertebral del sector de la producción animal. Unos bajos índices reproductivos es una de las principales causas de pérdidas económicas en las industrias animales en todo el mundo (Verma et al., 2012). Es por ello que la IA ha tenido desde sus inicios hasta la actualidad un impacto enorme en la mejora de la reproducción y de la genética de los animales de granja. Los avances que han hecho de la IA la más importante de las biotecnologías animales aplicadas hasta el momento, incluyen mejoras en recolección de semen, análisis y evaluación del espermatozoide, e inseminación propiamente dicha, así como en el manejo de los sementales. Pero el manejo animal no solo es importante en los machos sino que es decisivo también en las hembras.

Foote en 1975 ya destacaba que nada sustituye un buen manejo en una granja y que es de gran importancia la detección del celo de las hembras para

alcanzar unos buenos índices reproductivos. El ganadero debe de observar cada animal al menos dos veces al día y debe conocer perfectamente los síntomas del celo (Foote, 1975). Al igual que Foote, otros autores también insistían en la importancia de este hecho (Barr, 1975; Stevenson & Britt, 1977; Lehrer et al., 1992). Precisamente un conocimiento exhaustivo del ciclo sexual de las hembras hizo posible que se pusiese en práctica la sincronización del celo (Lauderdale et al., 1974; Hafs et al., 1975), con lo cual se ha llegado a simplificar ciertos aspectos de la práctica de la IA (Stevenson & Pursley, 1994). Un avance sobresaliente relacionado con la sincronización del celo llegó de la mano del desarrollo de los protocolos de sincronización de la ovulación de las hembras mediante el uso de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y de la PGF2a (Hafs et al., 1975; Pursley et al., 1995). Las vacas sometidas a esos tratamientos tenían mayores tasas de gestación a los 60 y a los 100 días (Pursley et al., 1997). Desde entonces varios protocolos han sido desarrollados para el control de la función folicular y luteínica, lo que posibilita la inseminación a tiempo fijo y conduce a conseguir mejores índices de preñez (Baruselli et al., 2012).

Además la IA ha proporcionado la base para el desarrollo de métodos y técnicas más modernas como son por ejemplo la criopreservación, el sexaje de semen, la fecundación in vitro (FIV), la transferencia embrionaria o incluso la clonación (Foote, 2002). Es además muy probable que la combinación de la IA con las nuevas biotecnologías emergentes constituya la base de los nuevos procedimientos de producción animal (Vishwanath, 2003).

Como se comentará más adelante la posibilidad de congelar el esperma por diversos procedimientos potenció el impacto de la IA en la producción animal ya que contribuyó enormemente a la globalización de esta técnica. El siguiente ejemplo puede ilustrar la magnitud de tal impacto: en 1965 casi todo el semen de toros producido en los Estados Unidos era congelado, lo que supone una enorme cantidad de dosis seminales. Un toro adulto y sano puede llegar a producir alrededor de 40.000 millones de espermatozoides por semana, y las compañías de IA producen dosis de semen con 15 millones de espermatozoides aproximadamente, aunque esta cifra puede variar dependiendo de la calidad del semen del toro. La mayoría de los toros que debido a sus cualidades como sementales están incorporados en un programa de recogida de semen constante pueden llegar a producir unas 100.000 dosis de semen congelado al año, y no es

raro que algunos sementales lleguen a producir o incluso superen la cantidad de 150.000 dosis. Esto supone que, incluso con una tasa de concepción del 33%, un toro que produzca 150.000 dosis de semen al año, podría llegar a tener una descendencia de 50.000 crías en un año. Esta enorme eficiencia reproductiva del ganado bovino a través del semen congelado y la facilidad para transportar el semen a prácticamente cualquier lugar del mundo, han contribuido enormemente a la consolidación y globalización de la IA (Funk, 2006).

Recientemente se han publicado otros datos igualmente reveladores en cuanto al uso de la IA en el ganado vacuno lechero, información que demuestra claramente lo que representa esa técnica en producción animal (Bols et al., 2010). En el año 1995 el número total de dosis producidas en el mundo excedía los 200 millones y en el año 1998 alrededor de unos 260 millones, siendo semen congelado en el 95% de los casos (Thibier & Wagner, 2002; Thibier, 2005). En ese mismo año de 1995 se intercambiaron internacionalmente alrededor de 20 millones de dosis, lo que supuso un 10% de la producción mundial total. Norteamérica y Europa fueron los mayores exportadores y Sudamérica la región del planeta que más semen importó. Esta tendencia en el comercio internacional del semen congelado refleja la globalización del mercado de la producción animal y el gran interés existente en el mundo para el intercambio de líneas genéticas entre países y entre empresas de reproducción animal (Bols et al., 2010).

Sin embargo no todo son ventajas en el uso y práctica de la IA. En un interesante análisis se han dado a conocer ciertos datos relativos a los pros y contras de esa técnica (Morrell, 2011), información que se resume a continuación:

Ventajas:

Previene la propagación de infecciones o enfermedades contagiosas que pueden ser transmitidas entre animales que mantienen un contacto estrecho o que comparten el mismo ambiente.

Permite una mayor velocidad en la mejora genética de los animales de producción al utilizar semen de machos que poseen mayor mérito genético.

Permite el cruzamiento de animales alejados geográficamente y de animales no contemporáneos (incluso después de la muerte del animal).

Permite el cruzamiento de animales con problemas de comportamiento o con anomalías físicas.

Sus ventajas se potencian cuando se une a las otras tecnologías de la reproducción, como la criopreservación o la separación espermática.

Es útil en la conservación de especies en peligro de extinción.

Desventajas:

Algunos sementales podrían transmitir virus sin presentan síntomas clínicos de enfermedad.

Existe la posibilidad de que algunas bacterias resistentes a los antibióticos con los que se procesa el semen se transmitan a través de la IA.

Un uso excesivo de determinados sementales mediante la IA puede suponer una pérdida de la variabilidad genética.

Ha habido un descenso de la fertilidad en ganado vacuno lechero y en ganado equino asociado a un incremento de la IA.

Precisamente el que en la actualidad existan inconvenientes en la práctica de la IA, algunos de ellos de cierta entidad, hace que laboratorios de todo el mundo, públicos y privados, trabajen con ahínco para conseguir optimizar la mencionada técnica. En ese sentido, prácticamente todas las fases y técnicas relacionadas con la IA están permanentemente en proceso de renovación y mejora, lo que es lógico teniendo en cuenta los datos comentados con anterioridad y la fecha en que se inicia la propia técnica.

La primera IA documentada de la historia la realizó Lazzaro Spallanzani en 1784. Éste biólogo y monje italiano dedicado al estudio de animales y plantas, logró inseminar artificialmente a una perra con semen fresco fruto de lo cual nacieron tres cachorros después de 62 días de preñez (Spallanzani, 1784). El mismo autor también comprobó que el líquido resultante de filtrar el esperma resultaba estéril mientras que el resto era fértil, y que el esperma enfriado con nieve sólo permanecía inmóvil hasta que se exponía nuevamente al calor, continuando móvil durante largo tiempo, iniciando así –casi por azar– el uso del frío en la conservación del semen.

Walter Heape en Inglaterra, afirmó que la IA era una práctica a la que no se le estaba dando la importancia que merecía, pero que a medida que se estudiase más a fondo mostraría su potencial desde el punto de vista científico y práctico. Concluyó además que un mismo eyaculado podría ser utilizado en varias hembras, y que la IA además de sus aplicaciones prácticas podría ser muy

útil en el estudio de factores genéticos (Heape, 1897). En Rusia Ivanoff consiguió la primera inseminación artificial en una yegua, y puso de manifiesto la importancia que tendría la IA en el desarrollo del sector primario y, por lo tanto, en la situación económica del país. En Rusia, la guerra y la revolución habían reducido enormemente la cabaña ganadera, que incluía a los animales de trabajo, y afirmaba Ivanoff que la recuperación económica sólo se produciría volviendo a recuperar el número de cabezas existentes antes del desastre civil, resaltando la importancia que tendría la IA para conseguir ese objetivo (Ivanoff, 1922), como posteriormente quedaría recogido (Milovanov, 1964).

Las noticias del uso de la IA en Rusia llegarían al resto de Europa de la mano de Arthur Walton, quién realizó los primeros experimentos que utilizaban la IA como técnica para predecir la fertilidad de los animales (Walton, 1927). En Dinamarca Eduard Sørensen organizó en 1936 la primera cooperativa de IA en ganado vacuno lechero con excelentes resultados, a la vez que diseñó un sistema de almacenaje del semen en pequeños tubos de celofán, que en definitiva serían los precursores de los que se utilizan en la actualidad (Sørensen, 1940).

Los avances seguían produciéndose pero era necesario plantearse la búsqueda de sustancias (aditivos/diluyentes) que permitieran conservar las propiedades fertilizantes del esperma. En Estados Unidos se realizaron las primeras pesquisas y se probaron diversos preparados a base de extractos de hígado de cerdo o suero y plasma de sangre bovina entre otras (Phillips & Lardy, 1940), pero fueron los diluyentes elaborados a base de yema de huevo los que mostraron efectos más esperanzadores en la conservación del semen (Lardy & Phillips, 1939; Phillips & Lardy, 1940). Esos diluyentes fueron mejorados con la adición de citrato sódico, que también facilitaba la observación del semen con el empleo del microscopio óptico, ya que dispersaba los glóbulos grasos de la yema de huevo (Salisbury et al., 1941). Los avances producidos en la conservación del semen supusieron un gran impulso en la IA. Las capacidades del semen se mantenían hasta tres días a temperatura de refrigeración y la fertilidad aumentó debido a que estas sustancias protegían al esperma de las bajas temperaturas (Foote & Bratton, 1949). Paralelamente al descubrimiento de los efectos positivos de la yema de huevo en los diluyentes del semen, se desarrollaron también otros elaborados a base de leche que mostraban resultados similares (Michajilov,

1950; Thacker & Almquist, 1953).

El siguiente paso en la mejora de la IA fue la adición de antibióticos a los diluyentes del semen. Los primeros antibióticos utilizados fueron combinaciones de penicilina, estreptomicina y polimixina. Su uso impidió la propagación de enfermedades y facilitó la erradicación de algunas, además, al actuar frente a posibles contaminaciones, reducía la muerte embrionaria y aumentaba la fertilidad (Almquist et al., 1949; Foote & Bratton, 1950; Foote, 1970; Almquist, 1975, Schenk et al., 1999). Incluso hoy en día son un componente indispensable en la elaboración de los diluyentes del semen.

Paralelamente a estos avances tuvo lugar en Inglaterra uno de los descubrimientos más sorprendentes y trascendentes en relación con el devenir de la IA. Polge y sus colaboradores descubrieron las propiedades que tenía el glicerol en la protección del espermatozoide frente a bajas temperaturas, marcando de esa manera el camino hacia la congelación del semen (Polge et al., 1949). Los primeros experimentos los realizaron sometiendo el semen de pollo a un tratamiento que consistía básicamente en sumergir durante 5 minutos una pequeña cantidad de semen que contenía un 15 ó un 20% de glicerol, en una solución a -79°C . Al descongelar las muestras observaron que el semen no solo mantenía su movilidad, sino que también conservaba sus potencialidades para fertilizar el ovocito (Polge, 1951). Ese descubrimiento causó un gran impacto y pronto se empezó a aplicar al semen bovino (Smith & Polge, 1950; Polge & Rowson, 1952).

Inicialmente las congelaciones de semen se realizaron con hielo seco $-\text{CO}_2$ en estado sólido- almacenándolo en ampollas de cristal, recipientes que tenían el inconveniente de que a veces rompían por un inadecuado manejo (Macpherson, 1960). Las ampollas de cristal fueron definitivamente sustituidas por pajuelas de plástico (Cassou, 1964). El nitrógeno líquido, que en un comienzo suponía un problema por su elevado coste se fue introduciendo y ganando terreno a los sistemas de congelación de semen previamente ensayados, ofrecía la posibilidad de almacenar el semen por tiempo ilimitado a la vez que su posterior uso conservaba unos índices de fertilidad aceptables (Macpherson, 1960).

La criopreservación, las mejoras en el almacenaje, y la mayor producción de dosis seminales debido a la posibilidad de diluir más el espermatozoide, permitieron dar respuesta a la demanda existente y aumentar la comercialización del semen.

Pero, como antes se apuntaba, no todo fueron ventajas ya que se pudo constatar que la crioconservación ejercía un efecto nocivo sobre los espermatozoides, lo que se acuñaría popularmente en la jerga de los especialistas con el nombre de “shock del frio”. Otro inconveniente se detectaba cuando se establecían comparaciones en índices de fertilidad entre el semen fresco y congelado, siempre favorables a la primera alternativa (Beatty et al., 1976; Parks & Graham, 1992; Shannon & Vishwanath, 1995).

Resultaba evidente que someter a los espermatozoides a un proceso tan agresivo como la congelación debía provocar daños en su estructura, por lo que los efectos negativos del mencionado shock del frio se estudiaron con detalle y se fueron determinando en unos casos con mayor precisión que en otros.

En la década de los setenta del siglo pasado quedó definida con absoluta claridad la composición estructural de las membranas celulares, integrada por bicapas de fosfolípidos con proteínas asociadas (Singer & Nicolson, 1972). La bicapa de fosfolípidos consta de dos cadenas de ácidos grasos poco solubles en medio acuoso (hidrófobas) que están unidas por un grupo fosfato a una cabeza hidrófila o soluble en agua. Las membranas celulares de los mamíferos tienen aproximadamente el 60% de fosfolípidos y el 40% de glucolípidos y colesterol (Alberts et al., 2011). Asimismo es importante resaltar que el agua es un elemento determinante en el funcionamiento de la membrana celular o, lo que es lo mismo, en el transporte a través de la membrana celular. Por consiguiente, los cambios drásticos de temperatura tendrían necesariamente que afectar a su mecanismo de actuación, porque no se debe perder de vista que el proceso de congelación por sí solo no significa gran cosa en el fenómeno de la cripreservación si no se le asocia con la descongelación. Es obvio que con la descongelación se pretende devolver a las células al estado que tenían antes de la congelación. En definitiva, por las propias características estructurales y funcionales de la membrana plasmática de los espermatozoides se suponía que serían especialmente sensibles a experimentar cambios de entidad a medida que la temperatura del medio celular se modificase, en este caso hacia la baja.

Estudios llevados a cabo por diversos autores pusieron de manifiesto el efecto del colesterol como protector contra el frio ya que provocaba una variación en la composición de los ácidos grasos y, en cierta medida, inhibía la formación de cristales (Darin-Bennett & White, 1977; Watson, 1981; Drobnis et al., 1993).

Por otro lado, en cuanto a la susceptibilidad al shock del frío de los espermatozoides se refiere, se pudo determinar que estaba directamente relacionada con la cantidad de colesterol presente en la membrana plasmática. De esa forma se concluyó que el semen de animales como el toro, el cerdo o el carnero, que poseen proporcionalmente menor cantidad de colesterol que el de otras especies son más sensibles a las bajas temperaturas (White, 1993). Quedaba patente por lo tanto que uno de los daños más importantes del shock del frío se producía en la estructura de la membrana plasmática. Esa membrana estaba afectada por un cambio de fase cuando la temperatura descendía hasta los 0°C al pasar del estado líquido a un estado gel, por lo que provocaba un estrés y una alteración en el funcionamiento de las membranas (Watson, 1995; 2000).

Otra evidencia lógica, derivada del alto contenido en agua de la célula de los eucariotas estimada en el 70% (Alberts et al., 2011), era la relativa a los cambios osmóticos que provocaban las consiguientes variaciones de volumen en los espermatozoides en el proceso de la criopreservación (Hammerstedt et al., 1990). Se constató que el primer ajuste de volumen celular ocurría tras la adición del crioprotector a los espermatozoides en un medio isotónico. A continuación se iniciaba una fase de retracción morfológica, que sucedía de manera rápida y que era consecuencia de la pérdida de agua intracelular, y con posterioridad se pasaba a un teórico retorno a la normalidad, en este caso lento, a medida que el crioprotector penetraba en las células. Un segundo cambio en el volumen celular se observaba al congelarse el agua extracelular, que produciría una salida de agua intracelular en respuesta a las altas concentraciones de sales en el medio extracelular. Los mismos cambios de volumen, pero en esta ocasión a la inversa, acontecerían también al descongelar el semen antes de proceder a la inseminación.

Quedaba demostrado que los daños producidos durante la criopreservación alteraban los porcentajes de motilidad espermática y la viabilidad de los espermatozoides, además de detectarse efectos perjudiciales en su interacción en el interior del aparato genital de la hembra, lo que tenía repercusiones en los índices de fertilidad (Medeiros et al., 2002). El efecto nocivo de la criopreservación alteraba el metabolismo general de las células (Martinez et al., 2006 ; Morris et al., 2012), llegando a dañar incluso la estructura de la

cromatina, con los consiguientes cambios del ácido desoxirribonucleico (ADN) (White, 1993; Bailey et al., 2000; Hallap et al., 2005; D'Occhio et al., 2007). Recientemente se han descrito efectos del frío sobre el citoesqueleto celular a consecuencia del papel regulador que ejercen las proteínas de esa estructura en los cambios osmóticos que se tiene lugar durante todo el proceso (Felipe-Pérez et al., 2012; John Morris et al., 2012).

A medida que la información comentada previamente se iba conociendo especialistas en distintas disciplinas se esforzaban en la búsqueda de crioprotectores que mejorasen las prestaciones de los ya existentes. Sin embargo, a pesar del tiempo transcurrido desde que Polge descubriese las características del glicerol como protector del semen (Polge et al., 1949) y de que han sido muchos los crioprotectores que se han ensayado impulsados desde diversas iniciativas (Jeyendran & Graham, 1980; Molinia et al., 1994), el glicerol se sigue considerando como uno de los agentes predilectos. El glicerol actúa sobre las propiedades del agua reduciendo su punto de congelación y hace que los cristales de hielo formados no sean demasiado grandes, por lo cual se aumentan las posibilidades de supervivencia celular (Mazur, 1984). Entre las numerosas alternativas probadas merece la pena señalar la insistencia con la que algunos autores han ensalzado las propiedades del metanol, pero sobre todo del etilenglicol (Guthrie et al., 2002). No obstante, la opinión más generalizada es que no existen razones objetivas suficientes para remplazar al glicerol por ningún otro de los conservantes que se han testado hasta la fecha en el proceso general de la criopreservación del semen de toro (Awad, 2011; Forero-Gonzalez et al., 2012; Taşdemir et al., 2012).

Algo similar ocurre con la utilización de la yema de huevo como crioprotector, aunque en este caso hay ciertas cuestiones que merecen ser comentadas. Desde que se comenzó a emplear se pudo constatar que la yema de huevo protegía al esperma frente al shock del frío, de manera particular frente al efecto de cambio de fases, de líquido a gel, producido durante el proceso de congelación (Drobnis et al., 1993). A pesar de esa evidencia, desde hace algún tiempo se está insistiendo en la necesidad de buscar un sustituto a la yema de huevo fundamentalmente para evitar el uso de sustancias de origen animal en cualquiera de los diluyentes de congelación, fuente de indudable riesgo contaminante (Holt, 2000). Aunque como en el caso comentado para el glicerol

también son bastantes las alternativas que se están estudiando, como por ejemplo los conservantes/diluyentes elaborados con extractos de soja (Van Wagendonk-de Leeuw et al., 2000; Aires et al., 2003), parece que la solución no es en absoluto sencilla (Holt, 2000).

Puede considerarse como una alternativa parcial el empleo de las denominadas proteínas de baja densidad (LDL) de la yema de huevo por su efecto beneficioso sobre el plasma seminal (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004; Bergeron et al., 2004). El plasma seminal, en cuya formación participan de manera determinante las glándulas genitales accesorias, sirve como medio de transporte de los espermatozoides hasta el tracto genital femenino, y desempeña un papel importante en procesos como la motilidad, viabilidad, o capacitación espermática. Sin embargo también posee factores que, aunque todavía no son conocidos con exactitud, se consideran perjudiciales en el proceso de la congelación del semen. Por ejemplo, se sabe que el plasma seminal de muchos mamíferos ungulados contiene unas proteínas especiales que son producidas en las vesículas seminales (BSP). Esas proteínas se unen al colesterol y a los fosfolípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides con lo que ejercen un proceso perjudicial para la conservación del espermatozoide. Pero como quiera que las BSP se unen a las LDL presentes en la yema del huevo de los diluyentes, estas últimas impedirán la salida de fosfolípidos de la membrana plasmática y permitirán la integridad de los espermatozoides. Algo parecido ocurre con los diluyentes elaborados con derivados de la leche, como es el caso de la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina que también interaccionan con las BSP del plasma seminal (Manjunath, 2012).

Otro aspecto que ha sido tratado con cierta minuciosidad ha sido la sensibilidad de los ácidos grasos de la membrana plasmática a los radicales libres de oxígeno (ROS). Con la finalidad de contrarrestar el estrés oxidativo producido por los radicales libres los espermatozoides están dotados de un sistema antioxidante natural (Beconi et al., 1993; Sikka, 1996). Los ROS generados por los espermatozoides, sobre todo los radicales O_2 y H_2O_2 (Sinha et al., 1996), juegan un papel importante en determinados procesos fisiológicos normales como la capacitación o la reacción acrosómica. Sin embargo cualquier proceso que suponga un desequilibrio entre ellos y la capacidad antioxidante del espermatozoide desencadenará un estrés oxidativo (Sikka, 1996) que tendrá lugar

fundamentalmente en la membrana plasmática, ya que la presencia de fosfolípidos con dobles enlaces la hacen especialmente vulnerable. Para frenar esta oxidación lipídica se han utilizado antioxidantes que pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Los enzimáticos son antioxidantes naturales como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa o glutatión reductasa. Los no enzimáticos son vitaminas, aminoácidos y sus derivados.

Los resultados de los estudios que valoran el uso de antioxidantes para mejorar la resistencia de los espermatozoides frente a la criopreservación han sido objeto de análisis, y en algunos de esos estudios se hacían test de varios antioxidantes simultáneamente, en diferentes concentraciones y junto con otras sustancias que demostraron propiedades crioprotectoras. Por ejemplo, en 1993 se estudiaron las propiedades de la taurina y la hipotaurina junto con otras sustancias como trehalosa y sacarosa, concluyendo que no mejoraban significativamente las variaciones en la motilidad o en la supervivencia espermática a la congelación (Chen et al., 1993). Años más tarde se analizaron los efectos de más de 250 combinaciones y concentraciones de la forma reducida del glucagón, de la enzima superóxido dismutasa, del ácido ascórbico, de la hipotaurina y del tempol en diluyentes elaborados a base de leche entera, observando solo una mejoría de la motilidad espermática post-descongelación en diluyentes con 0,5mM de glucagón. Se estimó que tampoco en este caso los efectos beneficiosos de los antioxidantes probados en aquellas circunstancias mejoraban a los elaborados con yema de huevo (Foote et al., 2002).

El α -tocoferol es otro antioxidante al que se le ha dedicado atención por su supuesta cualidad en proteger a los ácidos grasos insaturados de la membrana de los espermatozoides. Su uso en diluyentes preparados para aplicar a sistema de congelación del esperma de toros mostró mejores resultados que el uso de otros antioxidantes, y el semen de toros enriquecido con 5mg/ml era más eficaz en cuanto a fertilidad se refiere (Sariözkan et al., 2009).

Recientemente se ha comprobado que la cisteína y el glutatión no mejoraban la motilidad del semen de toros, aunque el porcentaje de espermatozoides con daños en el ADN después de la congelación sí se reducía tras la adición de estas sustancias (Tuncer et al., 2010). Por otro lado añadir vitamina B12 a los diluyentes de congelación sí que ha demostrado ser una forma sencilla y útil de mejorar las características del semen en la

descongelación (Hu et al., 2009; 2011). También la melatonina es un antioxidante útil en la criopreservación del semen bovino, que ha demostrado mejorar la motilidad y la integridad de los espermatozoides (Ashrafi et al., 2013).

Los antioxidantes estudiados son muy numerosos y los resultados muy dispares (Uysal et al., 2007; Hu et al., 2009; Sariözkan et al., 2009; Tuncer et al., 2010; Hu et al., 2011; Ashrafi et al., 2013). Según Bansal sería conveniente desarrollar técnicas sencillas y rápidas para medir tanto los ROS como el estrés oxidativo sufrido por el espermatozoide en su congelación. De esa manera habrá pautas con las que poder definir que antioxidantes seleccionar, en qué combinaciones y en qué concentraciones (Bansal & Bilaspuri, 2010).

Probablemente sea el colesterol el crioconservante más utilizado en los momentos actuales y al que sin ninguna duda se le dedica mayor atención en los laboratorios que se ocupan del estudio del proceso de la congelación del semen. De entre la larga lista de autores que trabajan en el tema merece la pena señalar a James K Graham, de la universidad de Colorado en Fort Collins, maestro de muchas escuelas distribuidas por el mundo. Como se ha mencionado con anterioridad el colesterol es un integrante habitual de las membranas plasmáticas, y por consiguiente también lo es de la de los espermatozoides, aunque su contenido en las membranas de estas células difiere bastante según la especie que se considere. Por lo tanto, enriquecer de forma artificial con colesterol las membranas de los espermatozoides de aquellas especies que sean deficitarias, como es el caso del toro, se supone que podría otorgar a las células de una mayor resistencia a la criopreservación.

La introducción de colesterol en la membrana de los espermatozoides se realizó a través de las ciclodextrinas. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos de glucosa que contienen un centro hidrofóbico capaz de incorporar lípidos, son de gran utilidad en la industria farmacéutica y otra de sus características es la capacidad que tienen para eliminar colesterol de la membrana plasmática (Christian et al., 1997; Singh et al., 2002). Aplicadas a los espermatozoides de los mamíferos el uso de las ciclodextrinas produjo una inestabilidad en la membrana plasmática y afectó a los procesos fisiológicos de esas células (Choi & Toyoda, 1998; Cross, 1999; Visconti et al., 1999; Iborra et al., 2000). Por otro lado, se comprobó que al eliminar el colesterol de la membrana de los espermatozoides de ratones las ciclodextrinas podían sustituir

in vitro el papel de la seroalbúmina bovina como inductor del conjunto de reacciones que permitirían la capacitación espermática y la posterior reacción acrosómica (Choi & Toyoda, 1998; Visconti et al., 1999). En el semen de humanos las ciclodextrinas también resultaron ser fuertes agentes capacitantes, asociadas incluso con una reacción acrosómica espontánea (Parinaud et al., 2000). Otros estudios también sugirieron que las ciclodextrinas incrementaban la motilidad de los espermatozoides y protegían a las células frente al shock del frío (Zeng & Terada, 2001a; 2001b). Incluso recientemente se han investigado los posibles efectos en el desarrollo embrionario al usar las ciclodextrinas en el semen de toros (Nagao et al., 2010). A pesar de que las ciclodextrinas son muy eficaces en la eliminación de colesterol de la membrana celular si son saturadas con colesterol previamente pueden producir el efecto inverso, en este caso beneficioso, al añadir colesterol a la propia membrana plasmática. En varios trabajos se observó que el porcentaje de espermatozoides que sobrevivían a la criopreservación o al shock del frío, era mayor cuando se sometían a un tratamiento con metil- β -ciclodextrina saturada con colesterol previamente a la criopreservación, observándose este fenómeno en varias especies de mamíferos, utilizando asimismo diferentes tipos de ciclodextrinas (Awad & Graham, 2002; Purdy & Graham, 2004a; Moce & Graham, 2006)

Purdy y Graham en el año 2004 estudiaron por primera vez el uso de las ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC) para la mejora del proceso de criopreservación del semen de la especie bovina. Afirmaron que la desestabilización de la membrana plasmática en el proceso de congelación tenía lugar fundamentalmente durante la transición de fase líquida a fase de gel, producida por el descenso de temperatura, y que en parte este fenómeno podría solventarse mediante la adición de lípidos (Purdy & Graham, 2004a). Igualmente resaltaron los resultados obtenidos con anterioridad por otros autores en el sentido de que cuando el colesterol era añadido a liposomas la transición de fases en la membrana de los liposomas producida por un descenso de temperatura se reducía, o incluso se eliminaba si la cantidad de colesterol añadida era considerable (Watson, 1981; Hammerstedt et al., 1990).

En los diferentes experimentos diseñados por Purdy y Graham (Purdy & Graham, 2004a) utilizaron sementales de la raza frisona en un momento puntual del año. La adición de las CLC al semen no se realizó de forma directa sino que

el semen fue diluido hasta alcanzar la concentración de 120 millones de espermatozoides por mililitro en diluyentes elaborados a base de tris o de citrato sódico, pero libres de yema de huevo. Después del proceso de incubación del semen con las CLC a una temperatura de 22°C durante 15 minutos, se le añadió otra porción de diluyente igual a la primera que ya contenía yema de huevo. Posteriormente al proceso de refrigeración, que siempre tiene lugar previamente a la congelación del semen y que en ese caso en particular duró 2 horas a 5°C, se añadió una tercera parte de diluyente que contenía el glicerol. Los autores señalaron que las CLC y el espermatozoide necesitaban incubarse en un medio libre de lípidos, y por lo tanto, añadir CLC al espermatozoide en un medio que ya tuviese yema de huevo no beneficiaría a su supervivencia tras la congelación. La mayoría de los lípidos de la solución provendrían de la yema de huevo y no del espermatozoide, por lo que gran parte del colesterol de las CLC sería transferido a las gotas de lípidos de la yema de huevo en lugar de a los espermatozoides.

Por otra parte emplearon varias concentraciones de CLC (ciclodextrina metil- β -ciclodextrina): 0.75, 1.5, 3, 4.5, 6 y 7.5mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides. Hay que destacar también la mención que se hizo en este trabajo a la temperatura y al tiempo de incubación de las CLC con el semen. Los autores probaron a incubar 1,5mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides en tres tiempos de incubación diferentes (15, 30 y 60min) y a dos temperaturas distintas (22 y 37°C). Por último, conscientes de que la criopreservación produce una capacitación prematura que reduce la fertilidad del semen (Cormier et al., 1997), y de que la pérdida de colesterol de la membrana plasmática juega un papel fundamental en el proceso de capacitación espermática, los referidos autores pensaron que la aplicación de CLC al semen podría reducir esta capacitación espermática prematura, aumentando el periodo de vida de los espermatozoides descongelados después de la criopreservación, además de aumentar el porcentaje de los que sobrevivan a este proceso.

El efecto que tendría la adición de colesterol en los procesos de capacitación espermática, de reacción acrosómica y su repercusión en la fertilidad, también fueron valorados en la misma época por los mismos autores (Purdy & Graham, 2004b). Consideraron que el momento en que un espermatozoide en particular inicia la capacitación espermática y la reacción acrosómica, así como la velocidad a la que se lleva a cabo este fenómeno,

depende en gran parte del estatus de la membrana plasmática y en particular de la cantidad de colesterol que ésta contiene. Durante la capacitación se pierde colesterol de la membrana plasmática, y cuando se pierde una cantidad suficiente la membrana se vuelve inestable, mejorando su habilidad para fusionarse con la membrana acrosómica externa y dando lugar a la reacción acrosómica (Nolan et al., 1992). Como la cantidad de CLC que se debería añadir al semen para optimizar el proceso de criopreservación aumenta hasta 2 ó 3 veces el contenido de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides (Purdy & Graham, 2004a), y debido a que el contenido de colesterol en estas membranas es tan importante en el mantenimiento de su integridad y en el proceso de capacitación, los autores consideraron lógico que la adición de colesterol pudiera afectar a la capacitación y a la reacción acrosómica. Esa fue la razón por la cual se evaluó la respuesta del espermatozoides tratado con CLC en cuanto a desarrollar la capacitación, la reacción acrosómica y su capacidad para fertilizar ovocitos. Para determinar tales análisis tanto las muestras control como las muestras tratadas con CLC fueron tratadas con heparina, fosfatidilcolina PC12, o ionóforo de calcio para capacitar e inducir la reacción acrosómica de forma artificial. La capacitación espermática fue determinada midiendo el nivel de calcio intracelular mediante citometría de flujo con la ayuda del fluorocromo Indo 1-AM, de manera que espermatozoides que contenían niveles bajos de calcio intracelular fueron considerados como no capacitados, mientras que espermatozoides con alto contenido de calcio intracelular fueron considerados capacitados o iniciando la capacitación. La reacción acrosómica la determinaron simultáneamente y también con la ayuda de la citometría de flujo y el fluorocromo *Arachis hypogaea*. Los resultados obtenidos fueron diferentes en función de si el semen era fresco o congelado. En semen fresco, las muestras tratadas con CLC desarrollaron unos índices de capacitación y reacción acrosómica menores que las muestras control, mientras que en semen congelado las muestras tratadas desarrollaron unos índices de capacitación y reacción acrosómica similares, independientemente del método utilizado. En otro de los experimentos realizados en el trabajo de referencia (Purdy & Graham, 2004b) se emplearon 5 sementales bovinos en un momento puntual del año. La aplicación de las CLC se realizó en el semen que previamente había sido diluido con diluyente compuesto por tris, ácido cítrico y glucosa, al que posteriormente

se le añadió la parte correspondiente de diluyente con yema de huevo. La cantidad de CLC utilizada en los experimentos fue de 1,5 mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides, CLC elaboradas con metil- β -ciclodextrina, e incubada con el espermatozoides durante 10 minutos a una temperatura de 23°C. La temperatura empleada para producir la reacción acrosómica con las sustancias antes mencionadas, fue de 39°C pero los tiempos variaron en función del método utilizado, siendo de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos para la fosfatidilcolina PC12 e inóforo de calcio, y 15, 45, 75, 105, 135 y 165 minutos para la heparina, a la que se añadía lipofosfatidilcolina. En relación a la fertilidad los autores comprobaron que en pruebas in vitro el semen criopreservado tratado previamente con CLC producía tasas similares de segmentación de ovocitos y formación de blastocistos que el semen no tratado. Además observaron que en pruebas de campo, los porcentajes de preñez eran similares con independencia de si el semen había sido tratado con CLC o sin tratar. Para los test de fecundación in vitro emplearon el semen de 5 sementales y ovocitos extraídos de ovarios de vacas sacrificadas en el matadero, mientras que en el estudio in vivo utilizaron el semen de 3 sementales que se aplicó a 77 novillas, que previamente habían recibido el correspondiente tratamiento hormonal para la sincronización del celo. En ambos trabajos (Purdy & Graham, 2004a; 2004b), la aplicación de las CLC se realizó siempre a muestras de semen que habían sido altamente diluidas.

Por su parte Mocé y Graham realizaron otra serie de experimentos para comprobar si las CLC podrían ser añadidas directamente a los eyaculados sin necesidad de diluir los mismos, o si la concentración de éstos podría afectar al resultado (Moce & Graham, 2006). En uno de esos experimentos se utilizaron 10 sementales bovinos de raza frisona en un momento concreto del año. Las dosis elegidas fueron de 2 a 4 mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides, elaboradas con metil- β -ciclodextrina, y los diluyentes estaban compuestos a base de tris y yema de huevo. La temperatura de incubación de las CLC con el semen fue de 22°C durante 15 minutos en tres de los cuatro experimentos, mientras que en el otro se compararon dos temperaturas de incubación, 22 y 37°C. Para comprobar si se pueden utilizar las CLC directamente a semen sin diluir se emplearon 61 eyaculados y cada uno de los eyaculados fue dividido en dos alícuotas. Una que actuó como control y la otra que fue tratada con 2mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides durante 15min a 22°C. Después de la

incubación, 60 millones de espermatozoides de cada una de las alícuotas fueron añadidos a 1 ml de diluyente con yema de huevo y tris, refrigerados a 5°C, diluidos nuevamente en proporción 1:1 con diluyente con glicerol, tris y yema de huevo, congelados y descongelados antes de su análisis.

En el experimento número 3 del trabajo en cuestión (Moce & Graham, 2006) se dedicó a probar las posibles aplicaciones prácticas de las CLC en la industria de la inseminación artificial. A tal fin, se comparó su efecto dependiendo de si el espermatozoide era congelado manualmente o por medio de un congelador programable. Para ello los autores recogieron 9 eyaculados que fueron divididos en dos alícuotas, una fue utilizada como control mientras que la otra se trató con 2mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides durante 15 minutos a 22°C. Después de la incubación, 60 millones de espermatozoides de cada una de las alícuotas fueron añadidos a 1 ml de diluyente con yema de huevo y tris, refrigerados a 5°C, diluidos nuevamente en proporción 1:1 con diluyente con glicerol, tris y yema de huevo, y envasados en pajuelas de plástico de 0,5ml. Posteriormente el semen fue congelado tanto en vapores de nitrógeno como en congelador programable. El semen congelado en congelador programable fue sometido a 8 velocidades de congelación (-5, -8, -10, -12, -15, -25, -35 o -50°C/min), desde una temperatura de 5°C hasta -80°C, y sumergido luego en nitrógeno líquido. El semen congelado manualmente fue colocado a 8 alturas diferentes durante 10 minutos antes de ser sumergido en el nitrógeno líquido (1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, o 8.5cm). Los resultados indicaron que cuando el semen es congelado en un congelador programable, el porcentaje de espermatozoides móviles, móviles progresivos y viables, es similar entre las muestras tratadas y las muestras control. Solamente en velocidades de congelación de -8, -12, y -50°C/min el porcentaje de espermatozoides viables fue superior en las muestras con CLC.

En toros también se ha valorado el empleo de las ciclodextrinas cargadas con otros derivados del colesterol. Se citan a título de ejemplo dos aportaciones; en una de ellas se comprobó que el semen tratado con ciclodextrinas conjugadas con pelargonato de colesterol mostraba mayores porcentajes de espermatozoides móviles y viables después de su descongelación (Amorim et al., 2009). En la otra se observó mayor resistencia a la criopreservación en semen tratado con ciclodextrinas conjugadas con colestanol (Moraes et al., 2010).

Otro de los grandes retos asociados al progreso de la IA se centró en conseguir las mejores herramientas que permitiesen realizar evaluaciones objetivas sobre la calidad del semen, y sobre la capacidad fertilizante del mismo, con lo cual las posibilidades de seleccionar dosis seminales estarían muy bien orientadas (Amann, 1989; Graham & Mocé, 2005). La mayor dificultad para conseguir esos objetivos venía dada por la cantidad de factores que eran necesarios evaluar y por la diferencia existente entre los mismos. Es decir, era imprescindible poder disponer de mecanismos capaces de analizar el conjunto de características de los espermatozoides que, en última instancia, hacen de ellos células fértiles. Esa es una de las razones por las cuales la tecnología desarrollada para evaluar la fertilidad del semen fue diversa. Se debe tener en cuenta que el estudio de la fertilidad en la producción animal cobra especial interés en el ganado vacuno lechero, donde la globalización de la genética y de la IA ha conducido a un deterioro en la fertilidad de los rebaños. Un uso inapropiado de los sementales y una selección genética centrada fundamentalmente en un incremento de la producción láctea sin considerar aspectos reproductivos, han sido las principales causas (Januskauskas et al., 2001; Rodríguez Martínez, 2012)

El estudio de las capacidades del espermatozoide mediante el empleo de la microscopía óptica, y con el empleo de diferentes tinciones tales como la eosina, el rosa de Bengala, el Tripan Azul o el Giemsa (Swanson & Bearden, 1951; Hancock, 1952; Campbell et al., 1953; 1956; Hackett & Macpherson, 1965; Cross & Meizel, 1989; Way et al., 1995), fue de las primeras herramientas utilizadas para estudiar las características morfológicas del semen, su relación con la fertilidad y los posibles daños ocasionados durante la criopreservación. Se pudo determinar sin embargo que un porcentaje relativamente alto de defectos en la forma de los espermatozoides, las llamadas anomalías mayores y menores, eran perfectamente visibles en el semen fresco (Barth & Oko, 1989). Esa circunstancia hizo que se plantease la necesidad de hacer estudios comparados entre el semen fresco y el semen descongelado, centrando la atención en el estudio de algunas de las deformaciones que se suponían más llamativas: variantes de cabezas anormales, cabezas sueltas, alteraciones nucleares como cráteres, vacuolas, efecto diadema, alteraciones en el acrosoma, gotas citoplasmáticas

proximales, alteraciones en la pieza intermedia o en la cola. Obviamente, los defectos morfológicos de los espermatozoides tendrían influencia en la fertilidad (Söderquist et al., 1991; Johnson, 1997; Gravance et al., 1998; Watson, 2000).

El tema de las anomalías morfológicas ha sido tratado desde diferentes perspectivas aunque siempre con la idea de definir la trascendencia que tal o cual variación pudiera tener sobre los índices de fertilidad del espermatozoide (Thundathil et al., 1998; 1999; 2000; Amann et al., 2000; Meyer & Barth, 2001; Thundathil et al., 2001; Al-Makhzoomi et al., 2008; Saacke, 2008).

A los sistemas de tinción convencionales utilizados en microscopía óptica para obtener datos de las características morfológicas de los espermatozoides se añadieron posteriormente los fluorocromos, que son moléculas que se fijan a las células y que emiten diferentes longitudes de onda por efecto de los rayos de luz. Este sistema se mostró de gran utilidad para comprobar con nitidez determinadas características inherentes a los espermatozoides (Harrison & Vickers, 1990; Leeuw et al., 1991; Garner et al., 1994; Garner & Johnson, 1995; Garner et al., 1997b; Thomas et al., 1997), aunque no se debe dejar de mencionar que el empleo de la fluorescencia requiere de un equipamiento más sofisticado, reactivos diversos y una pericia técnica específica, por lo cual no se puede considerar como una técnica rutinaria y es más cara que el uso de las tinciones consideradas como convencionales antes aludidas (Graham, 2001).

A pesar de las prestaciones que ofrecía, y sigue dando, el análisis morfológico de los espermatozoides, el descubrimiento de la citometría de flujo (Fulwyler, 1965; Dittrich & Göhde, 1969) aplicado con posterioridad al análisis del semen, supondría un avance definitivo para poder disponer de una determinación pormenorizada de la mayoría de las características de los espermatozoides. Además con los citómetros de flujo se podían repetir los análisis tantas veces como se deseara, daban información muy objetiva y permitían evaluar 10000 espermatozoides frente a las 200 células que habitualmente se consideran en el análisis más tradicional. En la actualidad la citometría de flujo es empleada en las grandes compañías dedicadas a la IA y en los laboratorios especializados en el análisis de semen para el estudio de diferentes características espermáticas, como son su viabilidad, la concentración, la capacitación espermática, la integridad del acrosoma, la función mitocondrial o el estatus del ADN (Christensen et al., 2005; Gillan et al., 2005; Hossain et al., 2011). Con el empleo

de la citometría de flujo se consigue el análisis simultáneo de muchas características seminales y hay una aproximación real a la evaluación global del espermatozoide en relación con la fertilidad. No obstante, opiniones autorizadas insisten en el hecho de que disponer de una prueba laboratorial con suficiente capacidad para predecir el potencial de fertilidad de una muestra de semen o de un semental destinado a la inseminación artificial es aventurado (Rodríguez Martínez, 2003). Por ello muchos de los estudios dedicados a la evaluación del semen y su relación con la fertilidad no se centraron en un único parámetro (Gillan et al., 2005; Kastelic & Thundathil, 2008; Martínez Pastor et al., 2010; Petrunkina & Harrison, 2011). Algunos detalles relacionados con parámetros individuales de los espermatozoides determinados por citometría de flujo se comentan a continuación.

Para el análisis de la viabilidad espermática mediante citometría de flujo han sido utilizados varios fluorocromos, aunque actualmente, uno de los más empleados consiste en la combinación de SYBR-14 y ioduro de propidio (IP). La efectividad de esta combinación ya ha sido evaluada tanto en semen fresco como en semen descongelado (Garner et al., 1994). También estas combinaciones han resultado muy efectivas en el análisis de semen procesado en diluyentes elaborados con yema de huevo, ya que el SYBR-14 y el IP permitieron la discriminación de los espermatozoides del resto de partículas presentes en estos diluyentes, haciendo innecesarios los pasos de lavado para eliminar las partículas de huevo (Nagy et al., 2003). Ambos fluorocromos tiñen el ADN de los espermatozoides con lo cual se elimina la ambigüedad surgida cuando los fluorocromos tiñen distintos componentes celulares. Utilizados en conjunto, el núcleo de los espermatozoides vivos emiten fluorescencia verde -SYBR-14- y las células degeneradas que han perdido la integridad de sus membranas emiten fluorescencia roja producida por el IP, ya que este último no es capaz de atravesar la membrana plasmática y solo teñirá a los espermatozoides muertos (Gillan et al., 2005).

El estudio de la concentración espermática, entendida como el número de espermatozoides por unidad de volumen, es considerado como uno de los factores importantes para medir porcentajes de fertilidad y, en consecuencia, es un factor al que se le dedica mucha atención en los centros dedicados a la IA. Una concentración espermática alta puede compensar defectos funcionales de

los espermatozoides, y cualquiera que sea su valor evidentemente condicionará el número de dosis seminales que se puedan elaborar. Como sucedió en la evaluación de este factor, inicialmente la concentración espermática se determinaba exclusivamente por simple recuento (hemocitómetro). Los espectrofotómetros introducidos más tarde, y todavía utilizados en la actualidad, dieron más precisión al análisis, aunque también tenían el inconveniente de que el resto de partículas que no son espermatozoides pueden alterar el resultado. La aplicación de la citometría de flujo para valorar la concentración espermática solucionó en parte los problemas derivados de la aplicación de los métodos anteriores (Petrunkina & Harrison, 2011).

Como paso previo a la reacción del acrosoma el espermatozoide debe experimentar la llamada capacitación espermática, que como su propio nombre indica supone que el espermatozoide es capaz de llegar y penetrar al ovocito de segundo orden. En ese sentido se sabe que el espermatozoide está sometido a una serie de transformaciones que afectan a todas sus estructuras y que acontecen en el aparato genital de la hembra. Determinados factores procedentes del epidídimo o del plasma seminal son liberados, los lípidos y las proteínas de la membrana se reorganizan, se inducen modificaciones bioquímicas, se generan pequeñas cantidades de radicales libres de oxígeno, la motilidad espermática aumenta y se inician complejos mecanismos de transducción. La verdadera capacitación espermática, no obstante, se adquiere en el oviducto del aparato genital femenino, lugar en el que existen lipoproteínas de alta densidad y que tienen la propiedad de captar colesterol (Ehrenwald et al., 1988; 1990). Mediante el empleo de la citometría de flujo también se pudo evaluar características directamente relacionadas con la capacitación espermática y han sido muchas y variadas las sustancias usadas para tal fin. Por un lado la merocianina, que presenta el inconveniente que marca o tiñe todo tipo de membranas degeneradas (Muratori et al., 2004), y por otro la clortetraciclina que, desde hace años, es el preferido por la inmensa mayoría de los especialistas (Ward & Storey, 1984; Maxwell & Johnson, 1997). Como la capacitación espermática conlleva alteraciones en el pH y en el nivel de calcio intracelular se usan igualmente el Indo-1 acetoximetilester (Indo-1 AM), o fluo-3-acetoximetilester (Fluo-3 AM), así como distintos anticuerpos unidos a compuestos fluorescentes, que se unen a proteínas involucradas en los procesos

fisiológicos de capacitación (Martínez Pastor et al., 2010).

Una vez que los espermatozoides seleccionados adquieren la condición de capacitación se debe evaluar el estado del acrosoma, datos que son fundamentales asociar con la reacción acrosómica (De Lamirande et al., 1997). Durante la citada reacción los espermatozoides liberan enzimas hidrolíticas que facilitarán el que la célula primero contacte y penetre después en el ovocito, es decir se produzca la esperada fertilización (Breitbart & Spungin, 1997). Una vez más la citometría de flujo vino a remplazar los métodos que hasta entonces se utilizaban para definir las características del acrosoma, que fundamentalmente eran procedimientos clásicos de morfología (Boersma et al., 2001). Con la finalidad de definir el estado del acrosoma por citometría de flujo se utilizaron diversos fluorocromos, como por ejemplo el anti-CD46 con buenos resultados en el estudio del semen de la especie humana (Martin et al., 2005; Grunewald et al., 2006). Sin embargo, distintas variedades de lectinas –unidas a algún componente fluorescente normalmente isotiocianato de fluoresceína– se han impuesto como marcadores. Entre ellas merece la pena citar a la *Pisum sativum agglutinin*, o la *Arachis hypogaea peanut agglutinin* (PNA) que es la lectina de elección cuando se analiza semen diluido en medios que contengan yema de huevo (Hossain et al., 2011).

Parece pertinente mencionar que la reacción acrosómica de los espermatozoides se puede desencadenar artificialmente mediante el uso de distintos compuestos. Uno de los más utilizados, el ionóforo de calcio A 23187, que tiene la peculiaridad de inducir una reacción sincronizada del acrosoma en un alto porcentaje de espermatozoides y, por otra parte, reduce el tiempo necesario para la capacitación espermática de los mamíferos (Talbot et al., 1976). Su uso permitió relacionar positivamente el porcentaje de reacción acrosómica inducida en el semen de toros y su potencial fertilizador en programas de inseminación artificial (Whitfield & Parkinson, 1995; Pereira et al., 2000).

La función y la integridad de las mitocondrias de los espermatozoides también son características susceptibles de medirse mediante el empleo de la citometría de flujo, siendo la rodamina 123 uno de los fluorocromos predilectos. Fue usada para medir la función mitocondrial de espermatozoides bovinos y sus resultados fueron comparados con el estudio de la motilidad espermática (Garner et al., 1997a), observando una relación entre la función mitocondrial, la viabilidad

medida mediante SYBR-14, y la motilidad. Se demostró que este fluorocromo es transportado al interior de las mitocondrias que llevan a cabo correctamente los procesos de respiración, y su acumulación en ellas produce fluorescencia verde que puede ser detectada mediante microscopios de fluorescencia o mediante citómetros (Graham, 2001). Otro fluorocromo de interés en el estudio de la actividad mitocondrial fue el 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-yoduro de tetraetilbenzimidazolilcarbocianina. Ese yoduro permitió diferenciar entre distintos grados de actividad mitocondrial, diferenciando espermatozoides con alto y con bajo potencial de membrana mitocondrial. Ese fluorocromo se acumula en el interior de las mitocondrias activas emitiendo fluorescencia verde, pero en mitocondrias con alta funcionalidad, con un potencial de membrana alto, se acumula en mayor cantidad formando agregados que emiten fluorescencia roja (Gillan et al., 2005).

El potencial fertilizador de una dosis seminal también se relacionó con la integridad de su ADN. Se determinaron varias causas que explicaban altos valores de fragmentación del ADN, como es el caso de agentes tóxicos, bien de forma directa o bien después de alterar los mecanismos de producción de espermatozoides (Van Loon et al., 1993), contaminación atmosférica, la adicción al tabaco en los humanos (Potts et al., 1999), o la edad (Gogol et al., 2002). No obstante, una de las principales razones de fragmentación resultó ser la exposición a los ROS que se generan durante el proceso de congelación y descongelación (Bilodeau et al., 2000), y que al ser muy reactivos dañan la estructura de los ácidos nucleicos (Ochsendorf, 1999; Aitken & Baker, 2004; Evenson & Wixon, 2006). Con la finalidad de evaluar el grado de desnaturalización del ADN de los espermatozoides se recurrió nuevamente al uso de los fluorocromos, con el naranja de acridina como el fluorocromo que ofrecía mejores prestaciones al usarse con la citometría de flujo. Así, el grupo de Evenson describió primero y patentó después la técnica SCSA que mide la susceptibilidad del ADN de los espermatozoides a su desnaturalización *in situ* tras la exposición durante treinta segundos a un pH de 1,2 (Evenson et al., 1980; Evenson & Jost, 2000). Mediante esta técnica se determinó lo que se denomina el índice de fragmentación del ADN (DFI), descrito alternativamente como células al margen de la población principal (COMPat). Según explicaron los autores en humanos, toros, caballos o verracos existe una fuerte correlación entre el

COMPat de 0-15%, 16-29% y $\geq 30\%$ y una elevada, moderada y muy baja fertilidad respectivamente. Incluso se afirmaba que si el esperma se sometía a técnicas de *swim-up* para incrementar el porcentaje de espermatozoides móviles, o si se sometía a técnicas de gradiente de densidades para quitar células muertas, muestras con $\geq 27\%$ COMPat no serían fértiles ni siguiendo la técnica FIV ni mediante la de inyección intracitoplasmática (Evenson & Jost, 2000). Sin embargo, un valor de un 30% en COMPat no necesariamente debía significar que el 70% restante tuviese capacidad fertilizante. Ese 30% es la “punta del iceberg”, ya que se cree que si un estrés físico o químico sobre el esperma ha producido ese valor de 30%, el mismo tipo de daño, aunque en menor medida, se extenderá por toda la muestra en suficiente cantidad para producir subfertilidad (Evenson & Jost, 2000). En la actualidad la técnica SCSA es la más empleada para medir el daño en el ADN espermático (Evenson, 2013).

Una de las características del semen que se ha considerado crucial para la evaluación del semen es la motilidad, y esa consideración se ha hecho desde diversos puntos de vista (Den Daas, 1992; Kjaestad et al., 1993; Liu & Foote, 1998). A principios de la década de los años ochenta surgieron los sistemas computerizados de análisis de movimiento para tratar de eliminar la subjetividad existente en la observación microscópica de la motilidad del semen. Lógicamente con el paso del tiempo y con los avances tecnológicos los ordenadores diseñados específicamente para el análisis de semen, sistemas popularizados con las siglas CASA, se fueron perfeccionando y en la actualidad es prácticamente la herramienta preferida para el tipo de análisis en cuestión. Los sistemas CASA permitieron un análisis objetivo de los distintos parámetros de la motilidad espermática, un factor esencial en el estudio de la calidad del esperma y de sus posibles correlaciones con la fertilidad.

Los sistemas CASA además de proporcionar objetividad al estudio de la motilidad espermática de los espermatozoides y de automatizar los análisis de semen en los laboratorios, también permitieron identificar diferentes subpoblaciones dentro de una misma muestra con características cinéticas diferentes (Muiño et al., 2008b). Además fueron, y siguen siendo, una gran ayuda para entender los efectos de la criopreservación (Muiño et al., 2009) en el semen, o para buscar la mejor forma de descongelar el semen antes de la inseminación (Muiño et al., 2008a). Al igual que sucede con la mayoría de las técnicas los

sistemas CASA también tienen algunas lagunas, que en ocasiones se han magnificado (Davis & Katz, 1993; Davis & Siemers, 1995; Krause, 1995; Mortimer, 2000; Verstegen et al., 2002; Contri et al., 2010; Lenz et al., 2011; Evenson, 2013).

La bibliografía especializada demuestra que el empleo del colesterol tiene distintas connotaciones que modifican en diversa medida la organización general de los espermatozoides y, por lo tanto, tiene repercusiones que van más allá de los efectos beneficiosos sobre los cambios de temperatura a que son sometidos los gametos masculinos durante el proceso de la criopreservación.





2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL

El presente trabajo se ha llevado a cabo íntegramente en Xenética Fontao S.A, empresa situada en la provincia de Lugo, concretamente en el término municipal de Esperante, con coordenadas 42° 58'25'' N y 7° 34'56'' (Datum: WGS84, Huso UTM 29). El conjunto de instalaciones y terrenos de la empresa ocupan una extensión aproximada de 18 hectáreas (Figura1). En consecuencia parece procedente hacer una breve descripción de sus características y se ha pensado que este apartado de material y métodos sería el lugar apropiado para incluir algunos datos de interés relativos a ese centro.

Xenética Fontao S.A. es una empresa pública que se creó en el año 1998 financiada por la Xunta de Galicia, por medio del Fondo Gallego de Garantía Agraria (FOGGA), así como por la aportación de la Asociación de Ganaderos Federación Frisona Gallega (FEFRIGA) y de la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de la Raza Rubia Gallega (ACRUGA). La empresa de referencia, además de disponer de un laboratorio de Xenética Molecular que ofrece servicios en el campo de la sanidad y producción animal mediante el estudio del ADN, gestiona el Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia. Aunque el número total de sementales estabulados en el citado Centro de Selección es variable la media anual es de 470 toros, de cuatro razas diferentes: frisona, rubia gallega, blanco azul belga y limusina. Xenética Fontao S.A. comercializa semen que es distribuido por toda España y el extranjero, siendo Brasil, Holanda, Alemania y Canadá los países a los que se más se exporta.

El sistema de selección de toros que se sigue en Xenética Fontao es como sigue. A su llegada todos los toros quedan en cuarentena un mínimo de 28 días, periodo en el que se les realizarán los test sanitarios establecidos oficialmente, es decir las pruebas de tuberculosis bovina, brucelosis bovina, leucosis bovina enzoótica, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea vírica bovina, así como las utilizadas para la detección del *Campylobacter fetus ssp* y *Trichomonas foetus ssp* según lo dispuesto en el Real Decreto 1550/2004, de 25 de junio, por el que se modifica el Real Decreto 2256/1994, de 25 de noviembre, en el que se fijan las exigencias de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones de esperma de animales de la especie bovina. En dicho Real

Decreto también se incorpora la Directiva 2003/43/CE y se especifican tanto las condiciones sanitarias aplicables a la entrada de toros en centros de inseminación artificial como los exámenes de rutina que deberán realizarse a los animales estabulados.

Finalizada la cuarentena, con los toros cuyos resultados de los análisis fueron favorables se inician las pruebas específicas para sementales, que determinarán su permanencia futura en las instalaciones. El test definitivo es el de la valoración genética que fundamentalmente se define por las características funcionales de su descendencia, prueba que tiene una duración variable pero que oscila entre los 5 y 6 años, tanto en los sementales de aptitud lechera como cárnica. Por ejemplo para el caso de toros de raza frisona hay que tener en cuenta que se les recoge semen a partir de los 14 meses de edad; a continuación del pertinente tratamiento, las dosis seminales se utilizan para inseminar a las hembras que estén en los programas de control lechero. Transcurridos los aproximadamente 9 meses de preñez tendrá lugar el nacimiento de la descendencia de estos toros en prueba, pero habrá que esperar 16 meses hasta que se pueden inseminar las hembras de la primera descendencia de los toros en prueba, y 9 meses más hasta que se produzca el primer parto de estas novillas. Al finalizar la primera lactación tras el análisis de los datos obtenidos, tanto de la producción láctea como de la calificación morfológica, se obtendrá la primera prueba de valoración genética del toro en cuestión.

2.1.1. Material biológico

Para llevar a cabo el estudio de la presente memoria se emplearon 12 sementales de la especie bovina pertenecientes a las razas frisona, limusina y rubia gallega, cuatro sementales de cada una de las razas. Todos los animales se encontraban estabulados en las dependencias del Centro de Selección y Reproducción Animal y, por lo tanto, sometidos a las mismas condiciones de alimentación, higiene y manejo. Al final de este apartado se incluye una reseña de cada uno de los sementales en donde constan los datos correspondientes a su identificación, su genealogía y valores raciales. A continuación se aclara el significado de las valoraciones que se consideran específicas para cada raza y que constan en las reseñas que se adjuntan.

A. Raza Frisona

Los índices genéticos para la raza frisona se expresan como desviaciones al nivel genético medio de una base genética de referencia establecida por la Confederación de Asociaciones de Frisona Española (CONAFE)

A.1 Índice Combinado (ICO)

Es un índice de selección que combina valores genéticos de producción y tipo, y que desde diciembre de 2009 según lo aprobado por la junta de gobierno de CONAFE aplica nuevos porcentajes en su cálculo. De su valor total un 22% lo aporta el dato de producción kilos/leche, un 5% el valor kilos/grasa, un 30% el valor kilos/proteína, un 11% el índice de patas/pies, un 18% el índice de ubres, un 3% los días abiertos, un 3% el recuento de células somáticas, y un 8% el valor de longevidad.

A.2 Datos de producción

Indican la habilidad transmisora del toro para producción de leche así como sobre la cantidad de grasa y proteína que contiene la leche. Para el cálculo de esos valores CONAFE ha utilizado un modelo animal en el que se tienen en cuenta factores no genéticos que influyen sobre las producciones, tales como manejo animal, número de lactación, edad al parto, mes de parto o efecto ambiental. Valores positivos en dichos índices nos indicarán las capacidades lecheras de las hijas del semental en relación a la base genética establecida como referencia.

A.3 Caracteres funcionales

A.3.1 Longevidad o periodo de tiempo transcurrido desde el primer parto de la vaca hasta el final de su vida productiva. Estos resultados se transforman en una escala de media 100 y desviación típica 100. El valor 100 representa el valor genético medio de todos los toros con prueba oficial. Una prueba superior a 100 indica que ese toro tiene un mérito genético para longevidad superior al mérito genético medio de los toros con prueba oficial. Si es inferior a 100, indicará que su mérito genético para longevidad es inferior al valor medio de los toros con prueba oficial.

A.3.2 Recuento de Células Somáticas (RCS). Se presenta con una escala de media 100 y desviación típica 10, es decir, a mayor valor de la prueba de un toro menor recuento de células somáticas tendrán sus hijas debido a la genética. Al igual que en el cálculo de los valores de producción, CONAFE también ha utilizado un modelo animal que tiene en cuenta los mismos factores no genéticos

que influyen sobre la medida del recuento de células somáticas por lactación.

A.3.3 Días abiertos. Dato equivalente al valor obtenido cuando se restan 282 días al intervalo entre partos. El intervalo entre partos debe estar entre 300 y 600 días y los valores de días abiertos superiores a 250 se fijan todos en 250. Para su cálculo CONAFE ha utilizado un modelo animal multicarácter en el que se consideran los datos de días abiertos y kilos de leche a 120 días de los primeros partos, así como los datos disponibles de angulosidad y condición corporal. En el modelo de días abiertos también se tienen en cuenta factores no genéticos que influyen sobre las producciones, como son manejo, edad al parto y mes del parto. Las pruebas se multiplican por -1 de forma que los mejores animales son los que tienen el valor genético más alto. Se presentan con una escala de media 100 y desviación típica 10. A mayor valor de la prueba de un toro, menores días abiertos tendrán sus hijas debido a la genética, y serán por lo tanto más fértiles.

A.3.4 Velocidad de ordeño. Dato equivalente al valor tomado por el controlador en la primera lactación de cada animal. El controlador codifica la velocidad de ordeño en tres códigos: 1, ordeño rápido; 2, ordeño normal; 3, ordeño lento. También se ha utilizado un modelo animal en el que se tienen en cuenta factores no genéticos (manejo, edad al primer parto, mes del parto y días en lactación). Las pruebas obtenidas se multiplican por -1 de forma que los animales con valores altos son los animales que transmiten ordeños más rápidos. Como en otros caracteres funcionales, los datos posteriormente se transforman a una escala de media 100 y desviación típica 10, de forma que a mayor valor de la prueba de un toro más rápido es el ordeño de sus hijas debido a la genética.

A.3.5 Facilidad de parto. Expresada en porcentajes y diferenciada entre fácil, moderada y difícil.

A.4 Conformación

Se recogen datos de los 17 caracteres lineales y el carácter general “miembros y aplomos”. Los caracteres lineales son los recomendados por la Federación Mundial de Holstein-Frisón y evaluados por la International Bull Evaluation Service más el carácter “colocación de pezones posteriores”. Se utiliza un modelo animal en el que se tienen en cuenta factores no genéticos que influyen en la calificación de la vaca, como son el factor rebaño-visita-calificador, que compara las vacas que han sido vistas en el mismo rebaño por el mismo calificador, el factor ronda-calificador-parto, que tiene en cuenta los cambios en

las definiciones y en las formas de calificar de los caracteres lineales a lo largo de los años, el número de lactación y edad en el momento de la calificación, y el estado de lactación en el momento de la calificación. A partir de estas evaluaciones genéticas y teniendo en cuenta la información de parentesco a través de la genealogía, se calculan los índices que se definen a continuación.

A.4.1 Índice de Capacidad (ICAP). Incluye a su vez el carácter de angulosidad, que mide el ángulo y separación de las costillas así como la calidad del hueso.

A.4.2 Índice de Patas y Pies (IPP). Incluye caracteres como estatura, anchura de pecho, profundidad corporal y anchura y ángulo de la grupa.

A.4.3 Índice Compuesto de Ubre (ICU). Valora la inserción anterior de la ubre, la altura de la inserción posterior, el ligamento suspensor, la profundidad de la ubre, la longitud y la colocación anterior y posterior de los pezones.

A.4.4 Índice Global de Tipo (IGT). Tiene en cuenta las características como el ángulo podal, vista lateral y posterior de las patas y el carácter miembros y aplomos.

B. Raza Limusina

Es una raza de aptitud cárnica y que fue introducida en Xenética Fontao en el año 2010 bajo el programa de cruzamiento industrial puesto en marcha por la Consellería do Medio Rural de la Xunta de Galicia, con la finalidad de poner a disposición de los ganaderos de frisona información fiable sobre las principales razas y toros de aptitud cárnica con presencia en el mercado. Los índices genéticos de la raza limusina se expresan en una escala de media 100 respecto a una base común de referencia constituida por un conjunto de terneros de raza limusina controlados en diferentes estaciones de testaje durante los cinco años anteriores. Valores superiores a 100 indican una tendencia a mejorar las cualidades de la descendencia.

B.1 Índices genéticos

B.1.1 Índice sintético de morfología y crecimiento. Combina potencial de crecimiento, desarrollo muscular, desarrollo esquelético y el peso al nacimiento. Está calculado para no incrementar el peso al nacimiento, obtener un progreso máximo sobre el potencial de crecimiento y desarrollo muscular, y alcanzar una respuesta de desarrollo esquelético igual al 50% del máximo.

B.1.2 Potencial de crecimiento. Toros con una buena valoración en este índice producirán terneros más pesados.

B.1.3 Desarrollo muscular. Se calcula a partir de una puntuación lineal de caracteres relacionados con la aptitud cárnica de los animales, como por ejemplo la longitud y anchura de las nalgas, o la anchura del dorso o de la cruz.

B.1.4 Desarrollo esquelético. Se calcula a partir de una puntuación lineal de caracteres relacionados con el formato óseo que definen la estructura corporal, como por ejemplo la longitud del dorso y de la pelvis, el tamaño o la anchura de la pelvis entre otros.

B.1.5 Aptitudes funcionales. Indica la mayor o menor adaptación del animal a su medio ambiental y productivo.

B.1.6 Cualidades raciales o indicador del grado de fidelidad al estándar racial.

B.2 Controles en granja

B.2.1 Peso al nacimiento y a los 120 días.

B.2.2 Ganancia media diaria o diferencia entre el peso final y el inicial y dividida entre el número de días de cada período.

B.3 Controles en estación de testaje

B.3.1 Peso final.

B.3.2 Ganancia media diaria.

B.3.3 Peso a los 400 días.

B.3.4 Altura de la cruz, expresada como índice en relación a la serie.

B.3.5 Miostatina. El gen de la miostatina es el responsable del carácter culón o hipertrofia muscular. Se diferencian tres genotipos: $+/+$ (animales normales), $mh/+$ (animales portadores) y mh/mh (animales culones).

B.3.6 Desarrollo muscular, expresado en este caso como porcentaje por comparación con los contemporáneos de su serie. Por ejemplo un toro con desarrollo muscular de 72 perteneciente a un grupo de testaje con puntuación 52, tendría una puntuación global de desarrollo muscular de 138 ($72/52 \times 100$).

B.3.7 Desarrollo esquelético, expresado en porcentaje por comparación con los contemporáneos de su serie.

B.3.8 Aptitudes funcionales, expresado en porcentaje por comparación con los contemporáneos de su serie.

C Raza Rubia Gallega

Raza autóctona de Galicia utilizada en el cruce industrial con la raza Frisona. Para la valoración genética de sus sementales, ACRUGA proporciona los siguientes datos:

C.1 Valoración individual. Son los controles a los que son sometidos los toros entre los 8 y 14 meses de edad en la nave de testaje de ACRUGA.

C.1.1 Pesos en nave de testaje o pesos expresados en kilogramos al nacimiento, al destete y a los 12 meses de edad.

C.1.2 Calificación morfológica. Grado de proximidad al prototipo racial. Se realiza según un baremo que incluye aspectos relacionados con la estructura del animal (coloración de capa, pezuñas, mucosas y cuernos, desarrollo corporal, conformación general y órganos sexuales), desarrollo muscular y esquelético (que tiene en cuenta el cuello, cruz, espalda, lomos o la grupa) y capacidad funcional (que valora aspectos como los aplomos, las extremidades y la cabeza).

C.1.3 Ganancia media diaria.

C.1.4 Índice de conversión. Valora la cantidad de pienso en kilos que tiene que comer un animal para ganar un kilogramo de peso.

C.2 Pruebas de descendencia. Es la valoración que se realiza a los sementales en función de los controles de rendimientos de los hijos en las explotaciones.

C.2.1 Índice genético al nacimiento. Resultado de una transformación de la escala natural del peso en kilos al nacimiento a una distribución normal de media y varianza igual a 100. También se invirtió la escala, se multiplica por -1 , de manera que a mayor valor menor peso al nacimiento tendrán sus descendientes.

C.2.2 Índice genético al destete. Resultado de una transformación de la escala natural del peso en kilos al destete a una distribución normal de media y varianza igual a 100.

C.2.3 ICO. En esta raza el índice ICO engloba el índice genético de nacimiento y el de destete otorgándoles la misma importancia. También se expresa con media y varianza igual a 100.

C.3 Facilidad de parto o sistema de valoración de partos en diferentes categorías en función de la ayuda necesaria en el nacimiento de la descendencia.

2.1.1.1. Datos de los sementales

En las doce páginas siguientes se consignan los datos de los sementales según constan en los catálogos oficiales.

NOMBRE BONABAL
NOMBRE COMPLETO BOS BOLIVER BONABAL ET
CÓDIGO IA 111509
Nº REGISTRO ESPM1502468634
CROTAL SANITARIO ES021106122286
RAZA FRISONA
FECHA NACIMIENTO 16/03/2005



GENEALOGÍA

PADRE	END ROAD PVF BOLIVER ET-USAM0123586443
MADRE	LYNNCREST BW MARSHALL HORIZON-USAH0131471081
ABUELO MATERNO	MARA-THON BW MARSHALL ET-USAM0002290977
ABUELA MATERNA	LYNNCREST FORMATION HUSH ET-USAH0017378527
ABUELO PATERNO	OUT JOCK CHOICE AMEL ET-USAM0002231596
ABUELA PATERNA	END ROAD MATHIE BIG BANG ET-USAH0015458228
BISABUELO MATERNO	SHEN VAL NV LM FORMATION ET-USAM0002163822
BISABUELA MATERNA	LYNNCREST CONVERSE HAPPY ET-USAH0015209681

CARACTERÍSTICAS PROPIAS DE LA RAZA

ICO	2543																
PRODUCCIÓN	<table> <tbody> <tr> <td>LECHE</td> <td>511Kg</td> </tr> <tr> <td>GRASA</td> <td>24Kg 0,06%</td> </tr> <tr> <td>PROTEÍNA</td> <td>18Kg 0,02%</td> </tr> </tbody> </table>	LECHE	511Kg	GRASA	24Kg 0,06%	PROTEÍNA	18Kg 0,02%										
LECHE	511Kg																
GRASA	24Kg 0,06%																
PROTEÍNA	18Kg 0,02%																
CARACTERES FUNCIONALES	<table> <tbody> <tr> <td>LONGEVIDAD</td> <td>122</td> </tr> <tr> <td>R.C.S.:</td> <td>119</td> </tr> <tr> <td>DÍAS ABIERTOS</td> <td>105</td> </tr> <tr> <td>VELOCIDAD ORDEÑO</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>FACILIDAD DE PARTO</td> <td> <table> <tbody> <tr> <td>FÁCIL</td> <td>76,50%</td> </tr> <tr> <td>MODERADA</td> <td>22,14%</td> </tr> <tr> <td>DIFÍCIL</td> <td>1,36%</td> </tr> </tbody> </table> </td> </tr> </tbody> </table>	LONGEVIDAD	122	R.C.S.:	119	DÍAS ABIERTOS	105	VELOCIDAD ORDEÑO	90	FACILIDAD DE PARTO	<table> <tbody> <tr> <td>FÁCIL</td> <td>76,50%</td> </tr> <tr> <td>MODERADA</td> <td>22,14%</td> </tr> <tr> <td>DIFÍCIL</td> <td>1,36%</td> </tr> </tbody> </table>	FÁCIL	76,50%	MODERADA	22,14%	DIFÍCIL	1,36%
LONGEVIDAD	122																
R.C.S.:	119																
DÍAS ABIERTOS	105																
VELOCIDAD ORDEÑO	90																
FACILIDAD DE PARTO	<table> <tbody> <tr> <td>FÁCIL</td> <td>76,50%</td> </tr> <tr> <td>MODERADA</td> <td>22,14%</td> </tr> <tr> <td>DIFÍCIL</td> <td>1,36%</td> </tr> </tbody> </table>	FÁCIL	76,50%	MODERADA	22,14%	DIFÍCIL	1,36%										
FÁCIL	76,50%																
MODERADA	22,14%																
DIFÍCIL	1,36%																
CONFORMACIÓN	<table> <tbody> <tr> <td>ÍNDICE TIPO</td> <td>0,62</td> </tr> <tr> <td>ÍNDICE CAPACIDAD</td> <td>-0,58</td> </tr> <tr> <td>ÍNDICE PATAS Y PIES</td> <td>0,34</td> </tr> <tr> <td>ÍNDICE UBRE</td> <td>1,91</td> </tr> </tbody> </table>	ÍNDICE TIPO	0,62	ÍNDICE CAPACIDAD	-0,58	ÍNDICE PATAS Y PIES	0,34	ÍNDICE UBRE	1,91								
ÍNDICE TIPO	0,62																
ÍNDICE CAPACIDAD	-0,58																
ÍNDICE PATAS Y PIES	0,34																
ÍNDICE UBRE	1,91																

NOMBRE MONROI
NOMBRE COMPLETO BOS MORTY MONROI ET
CÓDIGO IA 111493
Nº REGISTRO ESPM1502419683
CROTAL SANITARIO ES051105990763
RAZA FRISONA
FECHA NACIMIENTO 14/12/2004



GENEALOGÍA

PADRE	STOUDER MORTY ET-USAM0017349617
MADRE	ANDORA RUBENS KIARA ET-USAH0050150599
ABUELO MATERNO	STBVQ RUBENS-CANM0005844883
ABUELA MATERNA	ANDORA DUSTER KYLEE ET-USAH0017036313
ABUELO PATERNO	SHEN-VAL NV LM FORMATION ET-USAM0002163822
ABUELA PATERNA	CRACIN AEROSTAR MELISSA-USAH0015172400
BISABUELO MATERNO	PEN-COL DUSTER ET-USAM0002147486
BISABUELA MATERNA	ANDORA BENCHMARK KARALEE ET-USAH0014855110

CARACTERÍSTICAS PROPIAS DE LA RAZA

ICO	2429						
PRODUCCIÓN	LECHE 1193Kg GRASA 10Kg -0,32% PROTEÍNA 27Kg -0,11%						
CARACTERES FUNCIONALES	LONGEVIDAD 96 R.C.S.: 105 DÍAS ABIERTOS 92 VELOCIDAD ORDEÑO 99 FACILIDAD DE PARTO <table> <tbody> <tr> <td>FÁCIL</td> <td>69,78%</td> </tr> <tr> <td>MODERAD.</td> <td>28,04%</td> </tr> <tr> <td>DIFÍCIL</td> <td>2,18%</td> </tr> </tbody> </table>	FÁCIL	69,78%	MODERAD.	28,04%	DIFÍCIL	2,18%
FÁCIL	69,78%						
MODERAD.	28,04%						
DIFÍCIL	2,18%						
CONFORMACIÓN	ÍNDICE TIPO 0,68 ÍNDICE CAPACIDAD 0,13 ÍNDICE PATAS Y PIES 0,35 ÍNDICE UBRE 1,03						

NOMBRE NADAL
NOMBRE COMPLETO BOS LODOS SHOTTLE NADAL ET
CÓDIGO IA 111586
Nº REGISTRO ESPM2702709472
CROTAL SANITARIO ES001106713998
RAZA FRISONA
FECHA NACIMIENTO 04/06/2006



GENEALOGÍA

PADRE	PICSTON SHOTTLE ET TL TV-GBRM0000598172
MADRE	BOS IGNITER AGRIA ET-ESPH1502073590
ABUELO MATERNO	SUMMERSHADE IGNITER ET TL-CANM0006466625
ABUELA MATERNA	BOS ASTRE AGRA ET-ESPH9201142969
ABUELO PATERNO	CAROL PRELUDE MTOTO ET-ITAM6001001962
ABUELA PATERNA	CONDON AERO SHARON-CANH0005373153
BISABUELO MATERNO	DUREGAL ASTRE STARBUCK ET TL-CANM0000392405
BISABUELA MATERNA	MEADOW BRIDGE TROIS CENT ET-CANH0004810364

CARACTERÍSTICAS PROPIAS DE LA RAZA

ICO		2527
PRODUCCIÓN	LECHE	804Kg
	GRASA	9Kg -0,20%
	PROTEÍNA	18Kg -0,08%
CARACTERES FUNCIONALES	LONGEVIDAD	117
	R.C.S.:	102
	DÍAS ABIERTOS	92
	VELOCIDAD ORDEÑO	111
	FACILIDAD DE PARTO	FÁCIL 75,75%
		MODERADA 19,57%
		DIFÍCIL 4,68%
CONFORMACIÓN	ÍNDICE TIPO	1,5
	ÍNDICE CAPACIDAD	0,92
	ÍNDICE PATAS Y PIES	1,49
	ÍNDICE UBRE	1,46

NOMBRE
NOMBRE COMPLETO
CÓDIGO IA
Nº REGISTRO
CROTAL SANITARIO
RAZA
FECHA NACIMIENTO

REDENTOR
 BOS REGGIE REDENTOR ET
 111545
 ESPM1502482751
 ES021106088772
 FRISONA
 17/06/2005



GENEALOGÍA

PADRE	TERRICK REGGIE-USAM0122554867
MADRE	FERRE JAMES KELLY-CANH0007184423
ABUELO MATERNO	SHOREMAR JAMES-CANM0005902195
ABUELA MATERNA	FERRE STORM KARA-CANM0006904682
ABUELO PATERNO	SECOND-LOOK JOLT-USAM0002149849
ABUELA PATERNA	TERRICK EMORY RIBBON-USAH0017227433
BISABUELO MATERNO	MAUGHLIN STORM-CANM0005457798
BISABUELA MATERNA	STBVQ MANDEL KARAMEL-CANH0006444544

CARACTERÍSTICAS PROPIAS DE LA RAZA

ICO		2500	
PRODUCCIÓN	LECHE	388Kg	
	GRASA	26Kg	0,13%
	PROTEÍNA	29Kg	0,18%
CARACTERES FUNCIONALES	LONGEVIDAD	118	
	R.C.S.:	112	
	DÍAS ABIERTOS	92	
	VELOCIDAD ORDEÑO	91	
	FACILIDAD DE PARTO	FÁCIL	76,98%
		MODERADA	22,74%
		DIFÍCIL	0,28%
CONFORMACIÓN	ÍNDICE TIPO	1,79	
	ÍNDICE CAPACIDAD	0,25	
	ÍNDICE PATAS Y PIES	1,54	
	ÍNDICE UBRE	0,77	

Sylvie Gounin

PADRE	ALASKA-FR2305313943
MADRE	BALANCE-FR2305304353
ABUELO MATERNO	ROMEO-FR2300542432
ABUELA MATERNA	SIDNEY-FR2351371902
ABUELO PATERNO	SANGLOT-FR1931199681
ABUELA PATERNA	SATURNE-FR2351368648
BISABUELO MATERNO	LOUXOR-FR1995010819
BISABUELA MATERNA	PERLE-FR2399054709

ÍNDICES GENÉTICOS	ÍNDICE SINTÉTICO DE MORFOLOGÍA Y CRECIMIENTO	114
	POTENCIAL DE CRECIMIENTO	111
	DESARROLLO MUSCULAR	116
	DESARROLLO ESQUELÉTICO	90
	APTITUDES FUNCIONALES	101
	CUALIDADES RACIALES	107
CONTROLES EN GRANJA	PESO AL NACIMIENTO	43Kg
	GANANCIA MEDIA DIARIA (0-120 DÍAS)	1167g
	PESO A 210 DÍAS	321Kg
	GANANCIA MEDIA DIARIA (NAC.-1º CONTROL)	1310Kg
CONTROLES EN ESTACIÓN DE TESTAJE	PESO FINAL	650Kg
	GANANCIA MEDIA DIARIA	1589Kg
	PESO A LOS 400 DÍAS	591Kg
	ALTURA DE LA CRUZ	95/serie
	MIOSTATINA	+ / +
	DESARROLLO MUSCULAR	133%
	DESARROLLO ESQUELÉTICO	73%
	APTITUDES FUNCIONALES	101%

NOMBRE	ECRIVAIN		
NOMBRE COMPLETO	ECRIVAIN		
CÓDIGO IA	117003		
Nº REGISTRO	FR3523794847		
CROTAL SANITARIO	FR3523794847		
RAZA	LIMUSINA		
FECHA NACIMIENTO	09/03/2009		
GENEALOGÍA			
PADRE	TURBOT-FR1931148681		
MADRE	URSINIA-FR3523794460		
ABUELO MATERNO	RUBIS-FR7233430345		
ABUELA MATERNA	JASPINE-FR3594048752		
ABUELO PATERNO	PLAN-FR6502359868		
ABUELA PATERNA	NAPHTA-FR1997006792		
BISABUELO MATERNO	HERCULE-FR8792002381		
BISABUELA MATERNA	DELHI-FR3588054429		
CARACTERÍSTICAS PROPIAS DE LA RAZA			
ÍNDICES GENÉTICOS	ÍNDICE SINTÉTICO DE MORFOLOGÍA Y CRECIMIENTO	116	
	POTENCIAL DE CRECIMIENTO	104	
	DESARROLLO MUSCULAR	115	
	DESARROLLO ESQUELÉTICO	104	
	APTITUDES FUNCIONALES	103	
	CUALIDADES RACIALES	114	
	CONTROLES EN GRANJA	PESO AL NACIMIENTO	47Kg
		GANANCIA MEDIA DIARIA (0-120 DÍAS)	1500g
PESO A 210 DÍAS		359Kg	
GANANCIA MEDIA DIARIA (NAC.-1º CONTROL)		1345Kg	
CONTROLES EN ESTACIÓN DE TESTAJE	PESO FINAL	629Kg	
	GANANCIA MEDIA DIARIA	1473Kg	
	PESO A LOS 400 DÍAS	595Kg	
	ALTURA DE LA CRUZ	99/serie	
	MIOSTATINA	+ / +	
	DESARROLLO MUSCULAR	136%	
	DESARROLLO ESQUELÉTICO	95%	
APTITUDES FUNCIONALES	101%		

NOMBRE ENIS JAMA
NOMBRE COMPLETO ENIS JAMA
CÓDIGO IA 117004
Nº REGISTRO FR6950498073
CROTAL SANITARIO FR6950498073
RAZA LIMUSINA
FECHA NACIMIENTO 02/03/2009



GENEALOGÍA

PADRE	TITENDO-FR798381275
MADRE	ANIS JAMA-FR6950352853
ABUELO MATERNO	PARFLASH-FR2915098417
ABUELA MATERNA	ROTA JAMA-FR6950000955
ABUELO PATERNO	MUSICIEN-FR2396040540
ABUELA PATERNA	NITENDA-FR0000285807
BISABUELO MATERNO	NIXON-FR2997020345
BISABUELA MATERNA	GRILLOTTE-FR6991004441

CARACTERÍSTICAS PROPIAS DE LA RAZA

ÍNDICES GENÉTICOS	ÍNDICE SINTÉTICO DE MORFOLOGÍA Y CRECIMIENTO	118
	POTENCIAL DE CRECIMIENTO	117
	DESARROLLO MUSCULAR	110
	DESARROLLO ESQUELÉTICO	107
	APTITUDES FUNCIONALES	84
	CUALIDADES RACIALES	87
CONTROLES EN GRANJA	PESO AL NACIMIENTO	45Kg
	GANANCIA MEDIA DIARIA (0-120 DÍAS)	1467g
	PESO A 210 DÍAS	356Kg
	GANANCIA MEDIA DIARIA (NAC.-1º CONTROL)	1353Kg
CONTROLES EN ESTACIÓN DE TESTAJE	PESO FINAL	656Kg
	GANANCIA MEDIA DIARIA	1625Kg
	PESO A LOS 400 DÍAS	609Kg
	ALTURA DE LA CRUZ	98/serie
	MIOSTATINA	+ / +
	DESARROLLO MUSCULAR	123%
	DESARROLLO ESQUELÉTICO	104%
	APTITUDES FUNCIONALES	71%

NOMBRE ENRICO
NOMBRE COMPLETO ENRICO
CÓDIGO IA 117001
Nº REGISTRO FR5703752532
CROTAL SANITARIO FR5703752532
RAZA LIMUSINA
FECHA NACIMIENTO 09/02/2009



GENEALOGÍA

PADRE	CASANOVA-FR5703638053
MADRE	RELEVE-FR5703153125
ABUELO MATERNO	ONTARIO-FR3598011529
ABUELA MATERNA	LADY-FR5795125583
ABUELO PATERNO	NEUF-FR2297004114
ABUELA PATERNA	OMBRELLE-FR8703200114
BISABUELO MATERNO	CONCORDE-FR8787012211
BISABUELA MATERNA	ABONDANCE-FR5785110007

CARACTERÍSTICAS PROPIAS DE LA RAZA

ÍNDICES GENÉTICOS	ÍNDICE SINTÉTICO DE MORFOLOGÍA Y CRECIMIENTO	116
	POTENCIAL DE CRECIMIENTO	108
	DESARROLLO MUSCULAR	109
	DESARROLLO ESQUELÉTICO	116
	APTITUDES FUNCIONALES	102
	CUALIDADES RACIALES	109
CONTROLES EN GRANJA	PESO AL NACIMIENTO	46Kg
	GANANCIA MEDIA DIARIA (0-120 DÍAS)	1367g
	PESO A 210 DÍAS	354Kg
	GANANCIA MEDIA DIARIA (NAC.-1º CONTROL)	1453Kg
CONTROLES EN ESTACIÓN DE TESTAJE	PESO FINAL	712Kg
	GANANCIA MEDIA DIARIA	1563Kg
	PESO A LOS 400 DÍAS	636Kg
	ALTURA DE LA CRUZ	103/serie
	MIOSTATINA	+ / +
	DESARROLLO MUSCULAR	133%
	DESARROLLO ESQUELÉTICO	113%
	APTITUDES FUNCIONALES	98%

NOMBRE CONDE AG
NOMBRE COMPLETO CONDE AG
CÓDIGO IA 622100
Nº REGISTRO CG011420
CROTAL SANITARIO ES041105815102
RAZA RUBIA GALLEGA
FECHA NACIMIENTO 16/09/2004



GENEALOGÍA

PADRE	ABRAGAN AG-CG008600
MADRE	PALOMA-CG007400
ABUELO MATERNO	ROMERO III AG-CG004726
ABUELA MATERNA	LUCERA-CG001947
ABUELO PATERNO	TEIXO I AG-CG608977M
ABUELA PATERNA	BROCA-CG001789
BISABUELO MATERNO	MARIPOSO-GU608861
BISABUELA MATERNA	PULIDA-CG688366

**CARACTERÍSTICAS
PROPIAS DE LA RAZA**

VALORACIÓN INDIVIDUAL	PESOS EN NAVE DE TESTAJE	NACIMIENTO	45Kg
		7 MESES (DESTETE)	309Kg
		12 MESES	690Kg
	CALIFICACIÓN MORFOLÓGICA		83,25
	GANANCIA MEDIA DIARIA (Kg/día)		1,921
	ÍNDICE DE CONVERSIÓN		4,38
PRUEBAS DE DESCENDENCIA	ÍNDICE GENÉTICO AL NACIMIENTO		86,62
	ÍNDICE GENÉTICO AL DESTETE		99,97
	ICO		87,424
FACILIDAD DE PARTO	PARIÓ SOLA		83,16%
	LIGERA AYUDA		15,79%
	FUERTE TRACCIÓN		1,05%
	CESÁREA		0,00%

NOMBRE MANTEIGO AG
NOMBRE COMPLETO MANTEIGO AG
CÓDIGO IA 622102
Nº REGISTRO CG011576
CROTAL SANITARIO ES071105994109
RAZA RUBIA GALLEGA
FECHA NACIMIENTO 01/12/2004



GENEALOGÍA

PADRE	MARELO IV AG-CV000563
MADRE	GALLARDA-CG004708
ABUELO MATERNO	TEIXO I AG-CG608977
ABUELA MATERNA	RUFINA-CG002164
ABUELO PATERNO	GALLARDO II AG-TC608916
ABUELA PATERNA	NAVARRA-CV888180
BISABUELO MATERNO	RUFO AG-S608633
BISABUELA MATERNA	PERULA-CG000278

**CARACTERÍSTICAS
PROPIAS DE LA RAZA**

VALORACIÓN INDIVIDUAL	PESOS EN NAVE DE TESTAJE	NACIMIENTO	49Kg
		7 MESES (DESTETE)	388Kg
		12 MESES	718Kg
	CALIFICACIÓN MORFOLÓGICA		80
	GANANCIA MEDIA DIARIA (Kg/día)		1,658
	ÍNDICE DE CONVERSIÓN		5,47
PRUEBAS DE DESCENDENCIA	ÍNDICE GENÉTICO AL NACIMIENTO		94,64
	ÍNDICE GENÉTICO AL DESTETE		95,02
	ICO		90,278
FACILIDAD DE PARTO	PARIÓ SOLA		64,42%
	LIGERA AYUDA		28,55%
	FUERTE TRACCIÓN		4,81%
	CESÁREA		1,92%

NOMBRE
NOMBRE COMPLETO
CÓDIGO IA
Nº REGISTRO
CROTAL SANITARIO
RAZA
FECHA NACIMIENTO

MIÑO AG
 MIÑO AG
 622110
 CG013632
 ES031106823490
 RUBIA GALLEGA
 11/10/2006



GENEALOGÍA

PADRE	ARROXO AG-NJ003210
MADRE	XATA-CG008963
ABUELO MATERNO	PERICO III AG-CG000553
ABUELA MATERNA	PASTORA-CG000648
ABUELO PATERNO	PLATERO AG-CG008033
ABUELA PATERNA	FIGUEIRA-BN000314
BISABUELO MATERNO	RUFO AG-S608633
BISABUELA MATERNA	PULIDA-CG688366

CARACTERÍSTICAS PROPIAS DE LA RAZA

VALORACIÓN INDIVIDUAL	PESOS EN NAVE DE TESTAJE	NACIMIENTO	43Kg
		7 MESES (DESTETE)	370Kg
		12 MESES	639Kg
	CALIFICACIÓN MORFOLÓGICA		81,5
	GANANCIA MEDIA DIARIA (Kg/día)		1,304
	ÍNDICE DE CONVERSIÓN		6,95
PRUEBAS DE DESCENCIA	ÍNDICE GENÉTICO AL NACIMIENTO		105,67
	ÍNDICE GENÉTICO AL DESTETE		97,05
	ICO		102,419
FACILIDAD DE PARTO	PARIÓ SOLA		
	LIGERA AYUDA		
	FUERTE TRACCIÓN		
	CESÁREA		

NOMBRE NICOLAS AG
NOMBRE COMPLETO NICOLAS AG
CÓDIGO IA 622116
Nº REGISTRO CN002257
CROTAL SANITARIO ES031107377700
RAZA RUBIA GALLEGA
FECHA NACIMIENTO 25/10/2007



GENEALOGÍA

PADRE	MANSO AG-CG009510
MADRE	GALLARDA-CN000740
ABUELO MATERNO	PASTOR III AG-CV001146
ABUELA MATERNA	MARELA-CN600892
ABUELO PATERNO	PACHOLO III AG-CG005834
ABUELA PATERNA	TEIXA-CG002206
BISABUELO MATERNO	FRAGAVELLA AG-CG682137
BISABUELA MATERNA	RUBIA-LN608563

**CARACTERÍSTICAS
PROPIAS DE LA RAZA**

VALORACIÓN INDIVIDUAL	PESOS EN NAVE DE TESTAJE	NACIMIENTO	48Kg
		7 MESES (DESTETE)	370Kg
		12 MESES	667Kg
	CALIFICACIÓN MORFOLÓGICA		80
	GANANCIA MEDIA DIARIA (Kg/día)		1,805
PRUEBAS DE DESCENCIA	ÍNDICE DE CONVERSIÓN		5,59
	ÍNDICE GENÉTICO AL NACIMIENTO		101
	ÍNDICE GENÉTICO AL DESTETE		111
	ICO		111
FACILIDAD DE PARTO	PARIÓ SOLA		64,62%
	LIGERA AYUDA		29,54%
	FUERTE TRACCIÓN		4,05%
	CESÁREA		1,79%

2.1.2 Material de laboratorio

2.1.2.1 Equipamiento

-Microscopio de contraste de fases Zeiss y microscopio de contraste de fases Olympus Eclipse E600, con sistemas de platina calefactada y ajustados a 37°C (Figura 2).

-Fotómetro Accucell (IMV Technologies, Francia), calibrado adecuadamente para el estudio de la concentración del semen bovino. Expresa los resultados en millones de espermatozoides por mililitro (Figura 3).

-Maquina de envasado de semen e impresión de pajuelas IS3 (IMV Technologies), incorporada en cabina de refrigeración calibrada a una temperatura de 4°C (Figuras 4 y 5).

-Equipo para la congelación del semen envasado (IMV Technologies), compuesto por bombona de nitrógeno líquido de 120 litros y arcón congelador (Figura 6).

-Citómetro de flujo Facs Calibur (Becton Dickinson) (Figura 7), dotado de las siguientes características técnicas ofrecidas:

A. Óptica, fija no seleccionable

A.1 Láseres. Un láser de iones de argón de 15mW y 488nm, un láser de diodo rojo de 635nm.

A.2 Detectores, FSC, SSC, FL1, FL2, FL3 y FL4.

A.3 Filtros, FL1 530/30, FL2 585/42, FL3 650LP, FL4 661/16.

A.4 Sensibilidad de Forward y Side Scatter, permite la distinción de plaquetas del ruido.

A.5 Resolución de Forward y Side Scatter. Optimizada para determinar linfocitos, monocitos y granulocitos.

A.6 Sensibilidad de fluorescencia. Límite de 750 moléculas de equivalente soluble de fluoresceína.

A.7 Resolución de fluorescencia o coeficiente de variación en FL2-Area < 3%, máximo valor para eritrocitos de pollo teñidos con yoduro de propidio.

B Procesamiento de la señal

B.1 Resolución: 1024 canales en todos los parámetros.

B.2 Rango dinámico: logarítmico, 4 décadas para cada fotodetector.

B.3 Tiempo, correlacionable con cualquier parámetro para estudios cinéticos u otras aplicaciones.

B.4 Procesamiento de pulsos o medidas de anchura y área disponibles para todos los parámetros.

B.5 Compensación, posible entre fotodetectores FL1 y FL2, entre FL2 y FL3 y entre FL3 y FL4.

C. Fluidos

C.1 Cámara de flujo. Cubeta de cuarzo con sección interna rectangular de $430\mu\text{m}$ x $180\mu\text{m}$ y superficies con revestimiento antirreflectante.

C.2 Velocidad de aspiración de la muestra a tres posibles velocidades: $12\mu\text{l/min}$, $35\mu\text{l/min}$, y $60\mu\text{l/min}$.

C.3 Tanques de fluidos con 4 litros de capacidad y sensores de llenado.

C.4 Concentración de la muestra de rango recomendado de 10^5 a 2×10^7 partículas/ml.

D. Adquisición de muestras

D.1 Sistema de adquisición. Tubos de citómetro de 12×75 mm con sistema FACS Loader elevador de tubos y sensores de posición.

D.2 Capacidad del rack de 40 tubos por rack.

E. Sistema operativo, MAC OSX 10.4.2.

F. Software

F.1 BD CellQuest Pro 5.2.1. Utilizado en la representación gráfica y en el análisis de las muestras.

F.2 Worklist Manager 4.2.1. Permite un análisis automático sin la presencia constante del operario.

F.3 Loader Manager 4.2.1. Utilizado en la limpieza del citómetro.

-Vagina artificial: Compuesta por un cilindro de caucho resistente provisto de una válvula, que lleva en su interior una funda de goma elástica sujeta a los extremos del cilindro por unas anillas. El agua caliente es introducida por la válvula del cilindro y permanece entre éste y la funda interna o camisa. Un cono de plástico se une a la vagina artificial por el extremo más ancho. En el otro extremo se acopla un tubo colector de cristal o de plástico para recoger el esperma. El cono y el tubo colector son recubiertos de una funda para proteger al semen de la luz y de los posibles cambios de temperatura (Figura 8).

-Equipamiento auxiliar

a. Baños termostáticos para eppendorf de $0,5\text{ml}$ y para tubos de citómetro.

b. Baños termostáticos para muestras de semen.

- c. Dispensador de volumen.
- d. Sistema de trazabilidad de muestras seminales, compuesto por chips electrónicos previamente colocados en la oreja de los sementales, pistola detectora de chip electrónico, receptor de información del chip, impresora de etiquetas y lector de código de barras (Figura 9).

Se menciona igualmente otro material de laboratorio cuyo uso es imprescindible en trabajos de esta naturaleza.

- a. Material de envasado. Pajuelas de 0,25ml (IMV Technologies, Francia), conectores y embudos desechables para envasado de semen bovino en la máquina de envasado e impresión IS3 (Figura 10).
- b. Termos criogénicos para el almacenaje de dosis seminales (Figura 11).
- c. Instrumental de laboratorio: tubos de vidrio milimetrados, tubos eppendorf, probetas y matraces, placas Petri de vidrio, pipetas, puntas de pipeta, portas, cubreobjetos, gradillas, guantes, aceite de inversión.

2.1.2.2 Reactivos y útiles varios

A continuación se citan los reactivos utilizados en el trabajo ordenados en grupos según su utilización, y acompañados de su fórmula química si procede, así como del laboratorio que los produjo y de su número de referencia.

a) Elaboración del diluyente seminal:

- Tris (HOCH_2)₃CNH₂ (Sigma, 154563)
- Ácido cítrico monohidrato $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K03564444)
- D(-)-Fructosa $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Sigma, F-3510)
- Glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) (Sigma, G-2025)
- Huevos de gallina

b) Elaboración de CLC:

- Metil- β -ciclodextrina (Sigma, C4555)
- Cloroformo CHCl_3 (Sigma, C2432)
- Metanol CH_4O (Sigma, 494437)
- Colesterol $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ (Sigma, C8667)
- Tris (HOCH_2)₃CNH₂ (Sigma, 154563)
- Ácido cítrico monohidrato $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K03564444)
- D-(+)-Glucosa (Sigma, G8270)

c) Elaboración de fluorocromos y soluciones para el análisis de viabilidad

espermática y termorresistencia:

- Cell Wash (Becton Dickinson, 439524)
- Facs Flow (Becton Dickinson, 342003)
- DMSO (Sigma, D-5879)
- Live/dead Sperm Viability Kit (Molecular Probes, L7011). Compuesto por los fluorocromos SYBR-14 y IP

d) Elaboración de fluorocromos y soluciones para la técnica SCSA:

- Acridine Orange 10mg/ml solution in water (Molecular Probes, A3568)
- Ácido Clorhídrico HCl (Merck, 1.00319)
- Hidróxido sódico NaOH (BDH-Prolabo, 28244.262)
- Cloruro Sódico NaCl (Sigma, S-5886)
- Triton-X 100 (Merck, 1.08603)
- Fosfato disódico Na_2HPO_4 (Sigma, S-5136)
- EDTA (Calbiochem, 324503)
- Ácido cítrico monohidrato $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K03564444)

e) Elaboración de fluorocromos y soluciones para el estudio de la reacción acrosómica:

- Cell Wash (Becton Dickinson, 439524)
- Facs Flow (Becton Dickinson, 342003)
- DMSO (Sigma, D-5879)
- Live/dead Sperm Viability Kit (Molecular Probes, L7011)
- Lectin PNA, Alexa Fluor 647 conjugate (Molecular Probes, L32460)
- Percoll 90% (Sigma, P-1644)
- Cloruro de Calcio CaCl_2 (Sigma, C-7902)
- Cloruro de Magnesio MgCl_2 (Sigma, M-2393)
- Ácido Láctico (Sigma, L-7900)
- Bicarbonato sódico NaHCO_3 (Sigma, S-5761)
- Seroalbúmina bovina BSA (Sigma, A6003)
- Piruvato (Sigma, P-4562)
- Gentamicina (Sigma, G1264)
- Cloruro potásico KCl (Sigma, P5405)
- Rojo Fenol (Sigma, P-4633)
- Hepes (Sigma, H-6147)

f) Reactivos para el análisis morfológico:

-Kit de tinción Spermac (Minitüb, 15405) compuesto por solución fijadora y soluciones A, B y C

-Citrato sódico $C_6H_5Na_3O_7$ (Merck, 106448)

g) Software:

-Cellquest Pro 5.2.1 (BD Biosciences)

-Worklist Manager 4.2.1

-Loader Manager 4.2.1

-WinMDI 2.8 (The Scripps Research Institute, La Jolla, California)

-Excel 2007 (Windows)

-SPSS 15.0

-New Jetprint 1.3 (IMV)

-Win 3T Digitcool 1.7 (IMV)

-Integrated Semen Analysis System (ISAS) 1.2



2.2 Métodos

2.2.1 Recogida de muestras

La extracción del semen y el manejo de los sementales se llevaron a cabo en la Sala de Recogida de Semen de Xenética Fontao S.A. y fue realizada por el personal especializado de la granja bajo supervisión. Para la obtención de las muestras seminales fue empleado el método de vagina artificial, manteniendo el agua de su interior a una temperatura de 45°C. Uno de los operarios se encargó de manejar a los sementales para hacerlos saltar sobre otro toro que ejercía de “potro”. Al mismo tiempo otro operario procedía a la extracción del esperma mediante el uso de la vagina artificial (Figura 12). Las muestras seminales obtenidas permanecieron en baño seco a una temperatura de 25°C hasta su primera valoración. Esta primera valoración se realizó de forma subjetiva empleando un microscopio Zeiss de contraste de fases con platina calefactada a 37°C. Posteriormente, para calcular la concentración espermática se utilizó el fotómetro Acucel. Para ello, en la cubeta del fotómetro se disolvieron 40µl de semen fresco en una solución de NaCl 0,15M hasta alcanzar una dilución 1:100.

El proceso de la recogida de muestras se repitió en cuatro periodos distintos correspondientes a las fechas que se detallan: 7.11.2011 al 21.11.2011; 9.01.2012 al 16.01.2012; 30.01.2012 al 13.02.2012; 12.03.2012 al 26.03.2012.

2.2.2 Preparación de las ciclodextrinas

El procedimiento fue el mismo que el utilizado por otros autores previamente (Purdy & Graham, 2004a) que consiste en diluir 200mg de colesterol en 1ml de cloroformo. En otro tubo diferente se disolvió 1g de metil-β-ciclodextrina en 2 ml de metanol. Una cantidad de 0,45 ml de la solución de colesterol fue añadida a la solución de ciclodextrina y la mezcla fue agitada hasta obtener una solución transparente. A continuación la solución fue vertida en una placa Petri de vidrio, los solventes fueron evaporados y los cristales resultantes fueron secados durante 24h, extraídos de la placa y almacenados en frascos de vidrio a temperatura ambiente.

Para facilitar la adición de las CLC a las muestras de semen, 50 mg de CLC fueron añadidos a una solución de trabajo [299,75mM tris, 94,98mM ácido cítrico monohidrato, 28,02mM D-(+)-glucosa; pH=7; 300 mOsm]. La solución

resultante fue mezclada mediante vórtex y fue la que posteriormente se añadió a las muestras de semen.

2.2.3 Procesado y dilución del semen

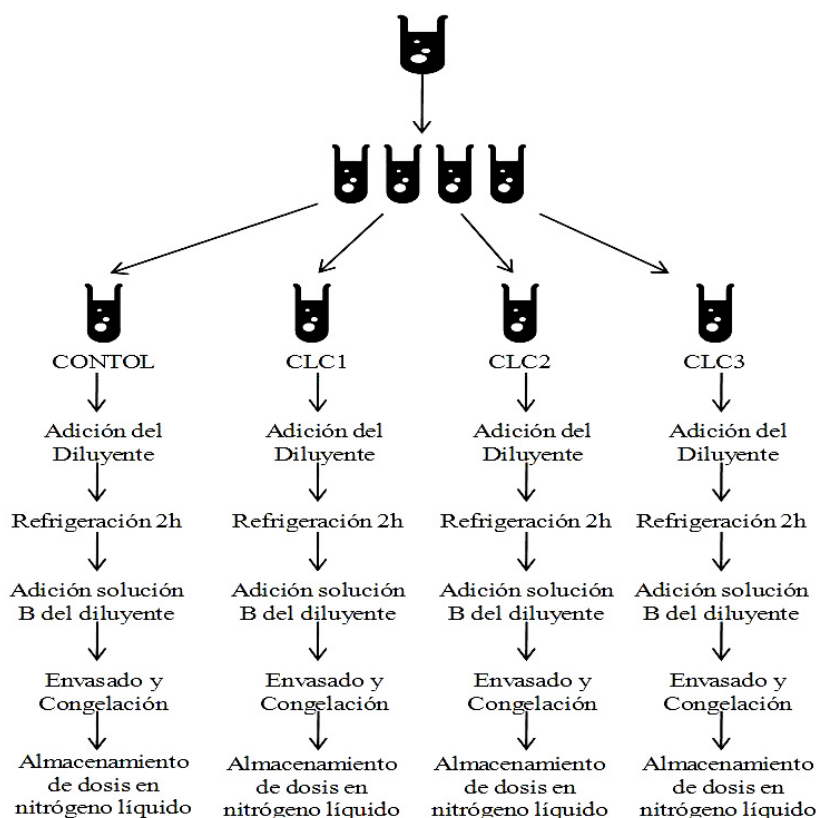
Debido a que el objetivo del estudio era analizar los efectos que tenía la adición de CLC en el esperma bovino de las tres razas especificadas en el capítulo de material biológico, el esperma -con la correspondiente dosis de CLC- se procesó de acuerdo con una pauta bien definida, que se detalla a continuación. La primera característica a analizar fue la viabilidad espermática. Mediante la ayuda de los fluorocromos SYBR-14 y IP se determinó el porcentaje de espermatozoides viables de cada una de las muestras. Ambos fluorocromos tiñen el ADN de los espermatozoides pero solamente el SYBR-14 es permeable a las membranas plasmáticas, mientras que el IP tiñe solamente a los espermatozoides con discontinuidades o roturas en sus membranas (inviabiles). Debido a que los espermatozoides marcados con SYBR-14 emiten diferente fluorescencia a la de los marcados con IP, y gracias a la ayuda del citómetro de flujo, se analizó el porcentaje de espermatozoides viables. Así mismo se estudió la evolución de la citada viabilidad a lo largo del tiempo, sometiendo las muestras a un tratamiento térmico prolongado (prueba de termorresistencia).

Además de determinar el porcentaje de espermatozoides viables evaluando la integridad de las membranas plasmáticas, también se evaluó la estructura del ADN presente en los espermatozoides. Para ello las mismas muestras fueron examinadas mediante la técnica SCSA que evalúa el índice de fragmentación del ADN. En dicha técnica, las muestras de semen fueron sometidas previamente a la acción de una solución ácida para proceder a la desnaturalización de la molécula de ADN. Posteriormente se tiñeron con una solución de naranja de acridina, un fluorocromo que emitirá una fluorescencia diferente dependiendo de si está unida a segmentos de cadena doble de ADN (fluorescencia verde) o si se une a segmentos de cadena simple (fluorescencia roja). Gracias a estas propiedades de la naranja de acridina, el citómetro puede diferenciar en qué proporción existía un daño en la estructura del ADN de los espermatozoides antes de que se sometieran a la acción del ácido, y si estos valores pudieran verse afectados por la adición de CLC.

Como se comenta en el apartado de revisión bibliográfica del capítulo

primero existen evidencias de que la adición de colesterol puede afectar a los mecanismos de reacción acrosómica de los espermatozoides. Por ello las mismas muestras analizadas mediante las técnicas anteriores se sometieron a una reacción acrosómica inducida artificialmente gracias a la acción del ionóforo de calcio. Antes de añadir esta sustancia, y tal y como se detalla en el apartado 2.2.5.4 “Reacción acrosómica”, las muestras se filtraron mediante un gradiente de densidades (Percoll) para eliminar los espermatozoides inmóviles, y se incubaron en una solución capacitante. Para el análisis en el citómetro se utilizaron los mismos fluorocromos empleados en el estudio de la viabilidad espermática más la lectina PNA, que se unirá a los acrosomas que hayan iniciado la reacción acrosómica y que emitirá una fluorescencia diferente a la emitida por el SYBR-14 y por el IP.

De cada uno de los 12 sementales especificados en el capítulo de material biológico se extrajo un eyaculado. A su vez de cada eyaculado se extrajeron 4ml y se procesaron y envasaron por separado. De esa cantidad, 1mililitro se utilizó como muestra control y el resto se trató de acuerdo con la siguiente pauta: 1mililitro con 2mg por cada 120 millones de espermatozoides (cantidad CLC1), 1mililitro con 1 mg por cada 120 millones de espermatozoides (CLC2), y 1mililitro con 0,5mg por cada 120 millones de espermatozoides (CLC3). Después de 20 minutos de incubación con las CLC, a 212°C, las muestras fueron diluidas en diluyente elaborado a base de yema de huevo. La administración del diluyente se realizó en dos fases, la primera, tras el período de incubación con las CLC, donde se administró la solución A libre de glicerol (2,42% tris, 1,8% ácido cítrico, 1% fructosa, y 20% yema de huevo en agua destilada), y una segunda fase tras un periodo de refrigeración de 2h a 4°C, tras la que se le añadió la solución B (2,42% tris, 1,8% ácido cítrico, 1% fructosa, 20% yema de huevo y 7% glicerol en agua destilada). La cantidad de diluyente administrada al semen fue la necesaria para producir dosis seminales de 0.25ml con una concentración de 25 millones por dosis, y la cantidad de solución A y B suministrada siempre fue la misma. El esquema que se incluye a continuación pretende clarificar la sistemática seguida.



2.2.4 Envasado y congelación de semen

El semen diluido fue envasado en pajuelas de 0,25ml. Tanto la impresión como el envasado fueron realizados en la máquina de envasado IS3, situada en cabina de refrigeración a una temperatura de 4°C. Los diferentes tratamientos con CLC se marcaron con distintos colores en las pajuelas para su mejor identificación. El semen control se envasó en pajuelas de color blanco, y el semen tratado con 2, 1 y 0,5mg por cada 120 millones de espermatozoides se envasó en color rojo, naranja y amarillo respectivamente. Después de ser envasadas, las pajuelas fueron introducidas en la criocámara del congelador programable, donde se realizó el proceso de congelación que se inició con una temperatura de 4°C, y finalizó alcanzando los -140°C con una duración promedio de 8 minutos. Al final del proceso de congelación las pajuelas fueron extraídas del arcón congelador y sumergidas en nitrógeno líquido a -196°C en los tanques de almacenamiento, donde permanecieron hasta su análisis posterior.

2.2.5 Análisis de las dosis seminales

La citometría de flujo mide la fluorescencia y dispersión que poseen las

células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz láser. Para ello es necesario que en el citómetro de flujo las células, espermatozoides en este caso, pasen una a una delante del láser. Al atravesar el rayo láser los espermatozoides interaccionan con éste causando dispersión de la luz. Midiendo la dispersión de la luz en sentido frontal se obtiene el parámetro denominado Forward Scatter (FSC), que evalúa el tamaño de las células, y midiendo la dispersión de la luz de manera lateral se obtiene el parámetro denominado Side Scatter (SSC) que proporciona información de la complejidad celular. Estos parámetros permiten diferenciar los espermatozoides del resto de estructuras que también están presentes en las muestras en el momento de su análisis (debris). Además de señales de dispersión, mediante el citómetro de flujo también se recoge la fluorescencia emitida por los espermatozoides que han sido marcados previamente con distintas moléculas fluorescentes o fluorocromos. Los fluorocromos son sustancias químicas que al ser estimuladas con fotones con longitud de onda determinada (longitud de onda de excitación), emiten a su vez otro fotón con longitud de onda mayor (longitud de onda de emisión). La fluorescencia emitida por los espermatozoides teñidos con fluorocromos después de ser incididos por la fuente de luz láser del citómetro, es filtrada según su longitud de onda por los filtros del citómetro y recogida por los detectores de luz.

El citómetro empleado, tal y como se especifica en el apartado 2.1.2. de material de laboratorio, posee 6 detectores. Dos detectores para señales de dispersión (FSC y SSC) y 4 detectores para señales de fluorescencia denominados FL1, FL2, FL3 y FL4. FL1 recoge una fluorescencia de $530\pm 30\text{nm}$, el detector FL2 $585\pm 42\text{nm}$, el detector FL3 recoge longitudes de onda superiores a 670nm y el detector FL4 $661\pm 16\text{nm}$. Además de los detectores otras piezas fundamentales en los citómetros de flujo son los espejos dicróicos que permiten la separación de la luz en función de su longitud de onda. El citómetro especificado en capítulo anterior posee 3 espejos dicróicos o dichroic mirror (DM), un DM 560 paso corto que sólo permite pasar una longitud inferior a 560nm , un DM 640 paso largo que sólo permite pasar una longitud superior a 640nm , y un 670 DM de paso largo que sólo permite pasar una longitud superior a 670 nm .

Después del análisis realizado por el citómetro, los datos obtenidos son almacenados en la memoria del ordenador y desde allí pasados a archivos

binarios que luego serán analizados por el software.

2.2.5.1 Viabilidad espermática

Para el estudio de viabilidad espermática se realizó la siguiente solución de trabajo. En 20ml de solución salina Cell Wash se añadieron 48µl de una solución de yoduro de propidio 2,4mM en agua destilada, y 8µl de una solución SYBR-14 100µM en DMSO. De esa solución se repartieron 500µl a los tubos de citómetro, uno por cada una de las muestras a analizar. Posteriormente se añadió 0,4µl de muestra a cada tubo de citómetro. Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos en baño seco a 37°C antes de ser analizadas en el citómetro de flujo. Se midió la fluorescencia de 10000 espermatozoides, usando el filtro 560 SP para detectar la fluorescencia del SYBR en el detector FL1, y un filtro 640 LP para detectar la fluorescencia del IP en el detector FL2. Los parámetros de análisis del citómetro fueron establecidos antes del análisis de las muestras. Una vez leída la primera muestra y ajustadas las regiones del citograma, éstas permanecieron invariables durante el resto de la lectura.

2.2.5.2 Resistencia térmica

El análisis de termorresistencia se realizó siguiendo el mismo procedimiento que el análisis de viabilidad espermática a los 0, 60 y 120 minutos de incubación en baño seco a 37°C.

2.2.5.3 Fragmentación de la cromatina

Para el estudio de la fragmentación de la cromatina se emplearon las mismas muestras que en los casos anteriores. El protocolo empleado fue muy similar al seguido por autores previos (Evenson & Jost, 2000). Un total de 10µl de semen fue disuelto en 1ml de solución TNE buffer (0,015N NaCl, 0,01M Tris y 0,001M etilen-diamoni-tetra-acético (EDTA), pH=6,8) hasta alcanzar una concentración de $1 \cdot 10^6$ spz/ml. De esta solución se tomaron 200µl y se introdujeron en tubo de citómetro, posteriormente se añadió 400µl de solución ácida (0,08N HCl, 0,1% triton-X 100, 0.15M NaCl, pH=1,2) durante treinta segundos exactamente, tiempo que se considera suficiente para que perfore la membrana plasmática, provoque la desnaturalización del ADN y permita el posterior paso del fluorocromo. A continuación se le añadió 1,2 ml de solución de

nararanja de acridina [$6\mu\text{g/ml}$ en buffer fosfato citrato ($0,1\text{M}$ ácido cítrico, $0,2\text{M}$ Na_2HPO_4 , 1mM EDTA, $0,15\text{M}$ NaCl)] que se une a la hebra de ADN, tanto a fragmentos simples como a fragmentos dobles. Antes de ser analizadas mediante citómetro de flujo, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 10 minutos para dar equilibrio a la nararanja de acridina y permitir mayor estabilidad hidrodinámica en la muestra con los fluidos. Se midió la fluorescencia de 5000 espermatozoides, usando un filtro 560 SP para recoger los valores de fluorescencia verde en el detector FL1, y un filtro 670 LP para recoger los valores de fluorescencia roja en el detector FL3.

La lectura de las muestras se realizó con el software Cellquest. Una vez leídas, los datos de citometría fueron recuperados usando el software WinMDI mediante el cual se representaron los citogramas, colocando en el eje de las abscisas la fluorescencia roja y en el eje de las ordenadas los valores de fluorescencia verde. Después de la eliminación del debris los datos se guardaron en formato texto. Posteriormente mediante la ayuda de la hoja de cálculo Excel, se creó la variable α_t , como resultado del cociente de la fluorescencia roja y la fluorescencia total (verde más roja). La nueva variable fue representada mediante un histograma con la ayuda del programa estadístico SPSS, donde se calcularon los valores de referencia de la variable α_t (SD_{α_t} , X_{α_t} , COMP_{α_t}). Los parámetros de análisis del citómetro fueron establecidos antes del análisis de las muestras, y antes del análisis de cada grupo de dosis se procesó una muestra de referencia para asegurar que los valores medios de fluorescencia roja y verde permanecían constantes. La población principal de esta muestra de referencia se situó entre los 400 canales de fluorescencia en el eje de las ordenadas y los 150 canales de fluorescencia en el eje de las abscisas.

2.2.5.4 Reacción acrosómica

Para el estudio de la reacción acrosómica se realizó previamente la siguiente solución de trabajo para el análisis en el citómetro de flujo: En 15ml de solución salina Cell Wash (Becton Dickinson) se añadieron $36\mu\text{l}$ de solución de yoduro de propidio $2,4\text{mM}$ en agua destilada, $6\mu\text{l}$ de solución SYBR-14 $100\mu\text{M}$ en DMSO y $37,5\mu\text{l}$ de PNA 1mg/ml . De esta solución de trabajo se repartieron $500\mu\text{l}$ a los tubos de citómetro, uno por cada una de las muestras a analizar. Asimismo también fue necesaria la preparación previa de las siguientes soluciones:

- Talp-semen (10M NaCl, 3,1M KCl, 0,4 μ M MgCl₂, 0,25 μ M NaH₂PO₄, 25 μ M NaHCO₃, 2 μ M CaCl₂, 0,03 μ M Rojo Fenol, 16,5 μ M ácido láctico, 10 μ M Hepes)
- Talp stock (1,14M NaCl, 3,23M KCl, 0,5 μ M MgCl₂, 0,3 μ M NaH₂PO₄, 25 μ M NaHCO₃, 2 μ M CaCl₂, 0,03 μ M Rojo Fenol, 7,65 μ M ácido láctico)
- FIV (10ml Talp-Stock, 6 mg/ml BSA, 0,4 μ M Piruvato, 0,25 μ g/ml Gentamicina)
- Sol 10x (1M KCl, 0,1M NaH₂PO₄, 0,8M NaCl, 0,1M Hepes)
- Percoll 45 (300 μ l Percoll 90, 300 μ l Talp-Semen)
- Percoll 90 (0,9 ml Percoll 90% 1,130g/cm³, 100 μ l sol 10X, 2mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 0,02mM ac. láctico, 0,025mM NaCO₃)

Posteriormente, en eppendorfs de 1,5ml y por cada una de las dosis a analizar se prepararon los gradientes de densidades o soluciones Percoll. Para ello se colocaron primeramente 400 μ l de solución Percoll 45 en el tubo eppendorf. Seguidamente se depositaron en el fondo del mismo tubo 400 μ l de solución Percoll 90, de manera que la solución Percoll permaneció con la solución Percoll 90 en la parte inferior del tubo eppendorf, y con la solución Percoll 45 en la parte superior. Además de las soluciones Percoll se prepararon también eppendorfs de 1,5ml con 400 μ l de solución FIV, uno por cada dosis de semen a analizar.

Una vez preparadas todas las soluciones necesarias para el análisis, se depositaron con cuidado 130 μ l de cada dosis seminal en la superficie de las soluciones Percoll, de manera que en la parte inferior del eppendorf se encontraba la solución Percoll 90, en el medio la solución Percoll 45 y el semen en la parte superior. Posteriormente se centrifugaron los eppendorfs a 12000 r.p.m. durante 5 minutos de forma que después de la centrifugación el semen móvil se depositó en el final del eppendorf, separándose así del diluyente de congelación y del resto del semen muerto e inmóvil (Figura 13). Después de la centrifugación se recuperaron 50 μ l de semen del sedimento y se introdujeron en eppendorf con la solución FIV. De esta nueva solución (FIV+ semen) se extrajeron 150 μ l que se depositaron en un nuevo eppendorf y que actuó como control, y otros 150 μ l que se depositaron en otro eppendorf y a los que se le añadió 0,375 μ l de solución de ionóforo de calcio (2mM en DMSO). De esta forma por cada dosis analizada se obtuvieron 2 muestras, una que no se sometió a la acción del ionóforo de calcio, que actuó como control de la reacción acrosómica, y otra cuya racción acrosómica se produjo artificialmente mediante el

ionóforo de calcio. Las muestras fueron incubadas durante 40 min en baño seco a 37°C.

Para su posterior análisis en el citómetro se introdujeron 20µl de cada muestra anterior en los tubos de citómetro que contenían 500µl de solución SYBR-IP-PNA y se dejaron incubar a 37°C durante 15min. Se midió la fluorescencia de 5000 espermatozoides, usando un filtro 560 SP para detectar la fluorescencia del SYBR en el detector FL1, y un filtro 640 LP para detectar la fluorescencia del IP en el detector FL2 y la fluorescencia del PNA en el detector FL4. Los parámetros de análisis del citómetro fueron establecidos antes del análisis de las muestras. Una vez leída la primera muestra y ajustados los cuadrantes del citograma, éstas permanecieron invariables durante el resto de la lectura.

2.2.6 Resumen del diseño de los experimentos

A partir de la dosis seminal de cada toro se prepararon 48 muestras de las que 12 se destinaron al primer experimento, 12 al segundo y 24 al tercero.

Para el primer experimento la distribución de cada muestra se especifica en la tabla correspondiente de la página siguiente: columna 1, número de muestra; columna 2, tratamiento (muestras 1, 2 y 3 sin tratamiento o muestras control; muestras 4, 5 y 6 2mg CLC; muestras 7, 8 y 9 1mg CLC; muestras 10, 11 y 12 0,5mg CLC;); columna 3, tiempo 0 minutos; columna 4, tiempo 60 minutos; columna 5, tiempo 120 minutos. Todos los valores vendrán dados en porcentajes.

Para el segundo experimento la distribución de cada muestra se especifica en la tabla correspondiente de la página siguiente: columna 1, número de muestra; columna 2, tratamiento (muestras 13, 14 y 15 sin tratamiento o muestras control; muestras 16, 17 y 18 2mg CLC; muestras 19, 20 y 21 1mg CLC; muestras 22, 23 y 24 0,5mg CLC; columna 3, número de células fuera del principal; columna 4, media obtenida; columna 5, desviación típica. En el estudio estadístico se consideran las columnas 3 (valores que vendrán dados en porcentajes) y 4.

Para el tercer experimento la distribución de cada muestra se especifica en la tabla correspondiente de la página siguiente: columna 1, número de muestra; columna 2, tratamiento (muestras 25, 26 y 27 sin tratamiento o muestras control; muestras 28, 29 y 30 sin tratamiento o muestras control inducidas con ionóforo

de Ca [+ lca]; muestras 31, 32 y 33 2mg CLC; muestras 34, 35 y 36 2mg CLC [+ lca]; muestras 37, 38 y 39 1mg CLC; muestras 40, 41 y 42 1mg CLC [+ lca]; muestras 43, 44 y 45 0,5mg CLC; muestras 46, 47 y 48 0,5mg CLC [+ lca]); columna 3, espermatozoides vivos con acrosoma reactivo; columna 4, espermatozoides muertos con acrosoma reactivo; columna 5, espermatozoides vivos con acrosoma íntegro; columna 5, espermatozoides muertos con acrosoma íntegro.

Lo recién consignado corresponde a la dosis seminal de un solo toro por lo que las 48 muestras se convierten en 576 para las dosis de los 12 toros y, posteriormente, en un total de 2304 muestras al realizarse la recogida en cuatro periodos distintos del año.

Experimento 1

1	2	3	4	5
1	0	%	%	%
2	0	%	%	%
3	0	%	%	%
4	2	%	%	%
5	2	%	%	%
6	2	%	%	%
7	1	%	%	%
8	1	%	%	%
9	1	%	%	%
10	0.5	%	%	%
11	0.5	%	%	%
12	0.5	%	%	%

Experimento 2

1	2	3	4	5
13	0	%	v.a	v.a
14	0	%	v.a	v.a
15	0	%	v.a	v.a
16	2	%	v.a	v.a
17	2	%	v.a	v.a
18	2	%	v.a	v.a
19	1	%	v.a	v.a
20	1	%	v.a	v.a
21	1	%	v.a	v.a
22	0.5	%	v.a	v.a
23	0.5	%	v.a	v.a
24	0.5	%	v.a	v.a

Experimento 3

1	2	3	4	5	6
25	0	%	%	%	%
26	0	%	%	%	%
27	0	%	%	%	%
28	0+	%	%	%	%
29	0+	%	%	%	%
30	0+	%	%	%	%
31	2	%	%	%	%
32	2	%	%	%	%
33	2	%	%	%	%
34	2+	%	%	%	%
35	2+	%	%	%	%
36	2+	%	%	%	%
37	1	%	%	%	%
38	1	%	%	%	%
39	1	%	%	%	%
40	1+	%	%	%	%
41	1+	%	%	%	%
42	1+	%	%	%	%
43	0.5	%	%	%	%
44	0.5	%	%	%	%
45	0.5	%	%	%	%
46	0.5+	%	%	%	%
47	0.5+	%	%	%	%
48	0.5+	%	%	%	%

2.2.7 Análisis estadístico

Para el tratamiento de la información procedente de los distintos experimentos llevados a cabo se ha optado por el modelo estadístico ANOVA con medidas repetidas, ya que se han obtenido muestras con repetición de cada toro, lo que supone la existencia de dependencia en los datos.

El tratamiento de los datos se ha realizado con el programa SPSS 15.0, y en todos los juicios de significación estadística se ha adoptado como nivel el 5%. (Kuehl, 2000).

2.2.8 Análisis Morfológico

El análisis morfológico del semen se realizó tanto en semen fresco, directamente después de su extracción, como en semen descongelado que fue sometido previamente a una dilución con diluyentes comerciales, y a los procesos de envasado, congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido.

Para la tinción de las muestras de semen se empleó el kit Spermac y se siguió el protocolo ofrecido por el fabricante con mínimas modificaciones. Para ello se realizó una dilución previa con citrato sódico al 3% hasta alcanzar una concentración de 20 millones por mililitro. Posteriormente se colocaron 40µl de semen en el extremo de un porta de cristal desengrasado que se extendieron posteriormente por toda la superficie con la ayuda de otro porta. A continuación se secaron las muestras y se fijaron en la solución fijadora del kit Spermac durante 5 minutos. Una vez fijadas, las muestras se secaron en platina calefactada durante 15 minutos y se lavaron posteriormente en agua destilada. La tinción con las soluciones A, B y C del kit Spermac se llevó a cabo de la siguiente manera: las muestras se sumergieron en la solución A durante 2 minutos y en la solución B y C durante 1 minuto, siguiendo siempre ese orden y lavándose las muestras con agua destilada entre cada una de las tinciones con las soluciones del kit.

Una vez secas, se analizaron las tinciones mediante observación directa en el microscopio de contraste de fases Nikon Eclipse E600 y con el objetivo de 100x. Con la ayuda de un contador se contaron 200 espermatozoides y se detectaron aquellos que presentaban alguna anomalía morfológica de acuerdo con los criterios de calidad de Xenética Fontao, dejando constancia en el formulario correspondiente, que se adjunta en el cuadro de la página siguiente. El

análisis morfológico se realizó por diferentes partes de la muestra, moviendo la paltina del microscopio de forma que no se observase la misma área del porta más de una vez. Asimismo, se realizaron capturas de imágenes con el software ISAS 1.2 con los objetivos de 20, 40 y 100 aumentos. Las fotografías obtenidas se procesaron con el programa Adobe Photoshop únicamente con la finalidad de ajustar el tono, brillo, intensidad y fondo.



FECHA ANÁLISIS:		RESPONSABLE ANÁLISIS:	
IDENTIFICACIÓN MUESTRA:		CLIENTE:	
TINCIÓN:	SPERMAC	OBSERV.:	
PLACA N°:		CAJA N°:	

DEFECTOS MAYORES	
Cabeza Subdesarrollada	
Formas Dobles	
Acrosoma Nudoso	
Cráteres	
Efecto Diadema	
Cabeza Piriforme	
Estrechamiento Base Cabeza	
Contorno Anormal Cabeza	
Cabezas Sueltas Patológicas	
Defecto Sacacorchos	
Defectos Pieza Intermedia	
Plegamiento Pieza Intermedia	
Gota Proximal	
Pseudogotas	
"Dag Defect"	
% DEFECTOS MAYORES	0,0 (Rango: < 20%)

DEFECTOS MENORES	
Cabezas Estrechas	
Microcefalia	
Cabezas Gigante y Corta Ancha	
Cabezas Sueltas	
Defectos Membrana Acrosomal	
Implantación Abaxial	
Gota Distal	
Cola Doblada	
Enrollamiento Distal	
% DEFECTOS MENORES	0,0

OTRAS CÉLULAS ANORMALES	
Células Epiteliales	
Eritrocitos	
Formas Medusas	
Células Redondas	
Linfocitos	
% OTRAS CÉLULAS ANORMALES	0,0

% TOTAL DE FORMAS ANORMALES

0,0% (Rango: < 30%)



3. RESULTADOS

3.1 Introducción

De acuerdo con lo descrito en el capítulo anterior, tanto en el apartado de material como en lo relativo a las cuestiones metodológicas o de procedimiento los resultados obtenidos se agrupan en tres bloques.

El primer bloque lo constituye el conjunto de datos obtenidos y se presentan recopilados en una única tabla con la denominación de “3.2 Datos generales”. En la citada tabla únicamente se marcan y se resaltan de manera especial los datos relativos a la dosis seminal del primer toro, es decir a las primeras 48 muestras, en correspondencia directa con la plantilla incorporada y descrita en el epígrafe 2.2.6 de “Resumen diseño de los experimentos”. El orden que sigue a continuación de las primeras 48 muestras corresponde a los toros 2 a 12. Según ello, se va cambiando la columna 5 por cada intervalo de 48 datos (muestras independientes), la columna 4 cambia cada 192 muestras (razas diferentes) y la columna 3 lo hace cada 576 muestras (épocas del año distintas en las que se recogió el semen). Las figuras 14, 15 y 16 facilitan la interpretación de los datos correspondientes a viabilidad (experimento 1), fragmentación (experimento 2) y reacción acrosómica (experimento 3).

El segundo bloque está dedicado en exclusividad al tratamiento estadístico de los datos recopilados por lo que se abre un epígrafe especial que lleva la numeración y denominación de “3.3 Estudio estadístico”. En él se recogen los resultados que se han considerado como más relevantes. Para ilustrar los resultados se integran en el texto sólo algunas de las tablas y gráficas proporcionadas por el programa SPSS 15.0, debido a la imposibilidad de incluirlas en su totalidad.

Finalmente el tercer bloque se dedica a las consideraciones generales de la morfología de los espermatozoides, de lo que se da cuenta en el apartado creado al efecto “3.4 Morfología”.

3.2 Datos generales

muestra	info	periodo	Raza	toro	datos	datos	datos	datos
1	c-1-1	1	1	1	44,37	41,6	28,14	
2	c-1-1	1	1	1	47,64	47,66	38,16	
3	c-1-1	1	1	1	44,23	43,04	32,69	
4	t-1-1	1	1	1	44,94	48,68	40,17	
5	t-1-1	1	1	1	41,95	47,99	39,28	
6	t-1-1	1	1	1	44,98	46,95	34,59	
7	t-2-1	1	1	1	48,83	51,61	42,17	
8	t-2-1	1	1	1	47,01	47,86	37,28	
9	t-2-1	1	1	1	48,05	50,50	39,75	
10	t-3-1	1	1	1	48,83	45,45	32,98	
11	t-3-1	1	1	1	50,31	49,66	40,00	
12	t-3-1	1	1	1	50,96	49,94	39,88	
13	c-1-2	1	1	1	2,09	255,49	45,95	
14	c-1-2	1	1	1	2,55	245,52	49,28	
15	c-1-2	1	1	1	2,51	245,14	50,54	
16	t-1-2	1	1	1	2,47	247,25	47,95	
17	t-1-2	1	1	1	3,08	250,88	51,54	
18	t-1-2	1	1	1	2,70	243,90	48,45	
19	t-2-2	1	1	1	2,99	244,70	50,05	
20	t-2-2	1	1	1	2,51	249,78	46,06	
21	t-2-2	1	1	1	3,13	245,26	51,38	
22	t-3-2	1	1	1	3,02	250,38	46,95	
23	t-3-2	1	1	1	4,99	247,59	51,71	
24	t-3-2	1	1	1	2,58	248,76	50,65	
25	c-1-3A	1	1	1	2,18	5,54	71,13	21,15
26	c-1-3A	1	1	1	2,06	4,22	77,64	16,08
27	c-1-3A	1	1	1	1,47	5,46	65,57	27,5
28	c-1-3B	1	1	1	34,63	12,87	26,63	25,88
29	c-1-3B	1	1	1	25,8	9,69	38,02	26,49
30	c-1-3B	1	1	1	26,09	12,50	30,61	30,79
31	t-1-3A	1	1	1	0,93	1,35	89,18	8,54
32	t-1-3A	1	1	1	0,7	1,49	88,81	9,00
33	t-1-3A	1	1	1	0,66	1,42	87,94	9,98
34	t-1-3B	1	1	1	16,66	7,09	56,91	19,34
35	t-1-3B	1	1	1	17	8,10	56,86	18,04
36	t-1-3B	1	1	1	15,87	8,91	53,59	21,63
37	t-2-3A	1	1	1	0,48	1,63	88,59	9,30
38	t-2-3A	1	1	1	0,49	1,61	88,13	9,77
39	t-2-3A	1	1	1	0,6	1,99	86,72	10,69
40	t-2-3B	1	1	1	20,21	10,78	45,22	23,79
41	t-2-3B	1	1	1	22,72	10,15	46,34	20,79
42	t-2-3B	1	1	1	20,67	10,15	46,31	22,87

43	t-3-3A	1	1	1	0,69	2,12	85,76	11,42
44	t-3-3A	1	1	1	0,62	2,29	85,18	11,90
45	t-3-3A	1	1	1	0,69	1,80	86,09	11,42
46	t-3-3B	1	1	1	29	11,24	38,15	21,62
47	t-3-3B	1	1	1	30,61	11,57	35,36	22,47
48	t-3-3B	1	1	1	27,78	11,25	36,82	24,15
49	c-1-1	1	1	2	34,17	27,33	24,63	
50	c-1-1	1	1	2	33,87	25,74	24,67	
51	c-1-1	1	1	2	31,99	25,92	26,07	
52	t-1-1	1	1	2	41,58	42,37	37,19	
53	t-1-1	1	1	2	40,99	38,28	36,74	
54	t-1-1	1	1	2	41,59	38,39	37,50	
55	t-2-1	1	1	2	40,54	38,53	37,42	
56	t-2-1	1	1	2	42,89	39,12	37,03	
57	t-2-1	1	1	2	41,73	41,35	37,60	
58	t-3-1	1	1	2	41,01	33,03	36,15	
59	t-3-1	1	1	2	43,38	33,73	35,70	
60	t-3-1	1	1	2	43,18	37,31	36,79	
61	c-1-2	1	1	2	3,71	240,72	59,50	
62	c-1-2	1	1	2	17,38	278,83	111,99	
63	c-1-2	1	1	2	6,37	246,42	69,83	
64	t-1-2	1	1	2	6,32	245,21	66,69	
65	t-1-2	1	1	2	4,6	248,08	57,86	
66	t-1-2	1	1	2	5,74	244,86	59,93	
67	t-2-2	1	1	2	5,01	249,05	58,48	
68	t-2-2	1	1	2	6,08	239,12	58,78	
69	t-2-2	1	1	2	5,56	236,56	56,80	
70	t-3-2	1	1	2	5,82	240,81	54,68	
71	t-3-2	1	1	2	5,02	228,9	61,36	
72	t-3-2	1	1	2	4,9	241,97	57,19	
73	c-1-3A	1	1	2	3,95	6,34	72,86	16,85
74	c-1-3A	1	1	2	4,19	5,89	72,64	17,29
75	c-1-3A	1	1	2	3,62	5,96	73,36	17,06
76	c-1-3B	1	1	2	41,45	13,80	21,51	23,24
77	c-1-3B	1	1	2	42,32	13,39	21,24	23,04
78	c-1-3B	1	1	2	41,38	13,59	20,70	24,33
79	t-1-3A	1	1	2	1,13	3,19	83,01	12,67
80	t-1-3A	1	1	2	1,04	2,96	82,32	13,67
81	t-1-3A	1	1	2	0,83	2,65	85,57	10,95
82	t-1-3B	1	1	2	36,69	11,58	33,80	17,93
83	t-1-3B	1	1	2	33,93	13,59	34,14	18,34
84	t-1-3B	1	1	2	33,11	11,75	38,61	16,52
85	t-2-3A	1	1	2	0,74	4,12	82,54	12,60
86	t-2-3A	1	1	2	0,88	4,04	81,93	13,15

87	t-2-3A	1	1	2	0,85	4,42	81,15	13,58
88	t-2-3B	1	1	2	35,06	15,45	30,21	19,29
89	t-2-3B	1	1	2	31,57	16,55	30,32	21,57
90	t-2-3B	1	1	2	31,04	16,41	30,87	21,68
91	t-3-3A	1	1	2	1,41	5,23	78,07	15,29
92	t-3-3A	1	1	2	1,37	4,37	81,21	13,05
93	t-3-3A	1	1	2	1,36	4,37	80,52	13,76
94	t-3-3B	1	1	2	33,79	18,39	25,04	22,78
95	t-3-3B	1	1	2	33,47	17,19	28,67	20,67
96	t-3-3B	1	1	2	34,70	16,62	27,50	21,18
97	c-1-1	1	1	3	43,38	39,21	35,66	
98	c-1-1	1	1	3	48,55	43,46	40,81	
99	c-1-1	1	1	3	45,34	42,87	34,65	
100	t-1-1	1	1	3	49,68	51,00	37,98	
101	t-1-1	1	1	3	55,39	55,90	44,57	
102	t-1-1	1	1	3	50,65	46,57	35,87	
103	t-2-1	1	1	3	49,77	44,98	38,66	
104	t-2-1	1	1	3	54,12	49,05	38,59	
105	t-2-1	1	1	3	55,80	52,84	42,85	
106	t-3-1	1	1	3	60,70	56,85	44,18	
107	t-3-1	1	1	3	63,82	57,22	45,64	
108	t-3-1	1	1	3	60,73	53,95	44,46	
109	c-1-2	1	1	3	3,22	254,04	47,26	
110	c-1-2	1	1	3	2,73	240,74	48,66	
111	c-1-2	1	1	3	2,37	242,02	44,47	
112	t-1-2	1	1	3	2,09	236,19	42,80	
113	t-1-2	1	1	3	2,12	230,06	41,50	
114	t-1-2	1	1	3	1,93	231,48	41,13	
115	t-2-2	1	1	3	2,07	234,39	44,43	
116	t-2-2	1	1	3	2,62	238,8	51,48	
117	t-2-2	1	1	3	2,17	232,15	44,19	
118	t-3-2	1	1	3	2,61	232,98	45,31	
119	t-3-2	1	1	3	1,85	232,84	41,96	
120	t-3-2	1	1	3	2,6	241,63	47,23	
121	c-1-3A	1	1	3	4,63	4,05	75,43	15,89
122	c-1-3A	1	1	3	4,76	4,20	77,49	13,55
123	c-1-3A	1	1	3	4,69	4,73	76,81	13,77
124	c-1-3B	1	1	3	43,17	8,30	27,84	20,69
125	c-1-3B	1	1	3	43,54	11,18	25,94	19,34
126	c-1-3B	1	1	3	41,11	10,58	25,44	22,88
127	t-1-3A	1	1	3	1,34	1,08	91,40	6,19
128	t-1-3A	1	1	3	1,25	1,06	91,47	6,22
129	t-1-3A	1	1	3	1,31	1,23	90,91	6,55
130	t-1-3B	1	1	3	20,37	9,27	51,57	18,78

131	t-1-3B	1	1	3	21,66	9,07	52,81	16,46
132	t-1-3B	1	1	3	21,69	10,89	49,26	18,17
133	t-2-3A	1	1	3	0,85	1,56	89,65	7,94
134	t-2-3A	1	1	3	0,61	1,27	92,32	5,80
135	t-2-3A	1	1	3	0,88	1,40	89,89	7,82
136	t-2-3B	1	1	3	21,82	14,17	41,83	22,17
137	t-2-3B	1	1	3	22,11	14,59	42,83	20,46
138	t-2-3B	1	1	3	19,58	14,95	40,69	24,78
139	t-3-3A	1	1	3	1,26	2,39	87,21	9,14
140	t-3-3A	1	1	3	1,76	2,82	86,55	8,86
141	t-3-3A	1	1	3	1,51	2,60	87,46	8,43
142	t-3-3B	1	1	3	23,59	17,31	33,75	25,35
143	t-3-3B	1	1	3	22,08	17,23	33,37	27,32
144	t-3-3B	1	1	3	27,28	15,69	34,28	22,76
145	c-1-1	1	1	4	30,06	28,11	23,28	
146	c-1-1	1	1	4	30,84	31,09	24,62	
147	c-1-1	1	1	4	27,78	26,76	20,75	
148	t-1-1	1	1	4	28,01	29,20	23,37	
149	t-1-1	1	1	4	26,83	26,49	23,97	
150	t-1-1	1	1	4	24,71	26,03	22,91	
151	t-2-1	1	1	4	28,00	29,37	26,72	
152	t-2-1	1	1	4	26,21	27,04	24,76	
153	t-2-1	1	1	4	24,58	27,50	24,46	
154	t-3-1	1	1	4	28,35	27,31	25,12	
155	t-3-1	1	1	4	27,99	27,27	24,02	
156	t-3-1	1	1	4	27,51	26,59	25,20	
157	c-1-2	1	1	4	8,42	242,74	58,80	
158	c-1-2	1	1	4	11,04	234,76	65,49	
159	c-1-2	1	1	4	10,45	239,49	59,82	
160	t-1-2	1	1	4	10,5	239,62	60,04	
161	t-1-2	1	1	4	9,45	225,47	57,34	
162	t-1-2	1	1	4	9,93	245,74	66,65	
163	t-2-2	1	1	4	10,82	246,79	67,87	
164	t-2-2	1	1	4	9,39	242,44	64,45	
165	t-2-2	1	1	4	8,9	239,23	64,03	
166	t-3-2	1	1	4	9,67	243,13	66,94	
167	t-3-2	1	1	4	11,11	244	65,85	
168	t-3-2	1	1	4	9,91	251,74	71,70	
169	c-1-3A	1	1	4	1,89	4,77	55,61	37,73
170	c-1-3A	1	1	4	2,20	5,53	56,72	35,55
171	c-1-3A	1	1	4	2,35	5,61	53,28	38,76
172	c-1-3B	1	1	4	30,79	9,02	28,05	32,14
173	c-1-3B	1	1	4	33,32	10,11	26,59	29,98
174	c-1-3B	1	1	4	28,52	11,14	26,20	34,14

175	t-1-3A	1	1	4	1,48	2,57	68,75	27,20
176	t-1-3A	1	1	4	0,78	2,35	69,32	27,55
177	t-1-3A	1	1	4	0,78	2,58	64,29	32,25
178	t-1-3B	1	1	4	20,63	5,50	46,35	27,52
179	t-1-3B	1	1	4	20,20	5,74	45,74	28,33
180	t-1-3B	1	1	4	18,51	6,73	45,08	29,68
181	t-2-3A	1	1	4	0,88	3,64	65,36	30,13
182	t-2-3A	1	1	4	0,88	2,79	70,53	25,80
183	t-2-3A	1	1	4	1,16	3,82	65,19	29,83
184	t-2-3B	1	1	4	15,29	9,28	40,32	35,11
185	t-2-3B	1	1	4	21,15	9,47	41,65	27,73
186	t-2-3B	1	1	4	20,24	10,10	38,76	30,91
187	t-3-3A	1	1	4	1,04	4,66	62,65	31,65
188	t-3-3A	1	1	4	1,37	4,54	60,48	33,61
189	t-3-3A	1	1	4	1,22	5,42	57,86	35,51
190	t-3-3B	1	1	4	20,71	10,66	32,74	35,89
191	t-3-3B	1	1	4	21,45	11,42	32,13	35,00
192	t-3-3B	1	1	4	21,12	10,57	30,63	37,69
193	c-1-1	1	2	5	52,23	52,19	46,25	
194	c-1-1	1	2	5	54,71	52,33	42,00	
195	c-1-1	1	2	5	51,03	50,34	44,34	
196	t-1-1	1	2	5	58,79	54,56	43,11	
197	t-1-1	1	2	5	56,50	53,27	44,51	
198	t-1-1	1	2	5	57,53	52,21	43,70	
199	t-2-1	1	2	5	50,36	52,74	38,29	
200	t-2-1	1	2	5	53,29	45,45	45,85	
201	t-2-1	1	2	5	50,71	47,59	33,86	
202	t-3-1	1	2	5	52,10	54,89	45,00	
203	t-3-1	1	2	5	54,41	59,26	43,86	
204	t-3-1	1	2	5	57,69	64,80	43,26	
205	c-1-2	1	2	5	2,82	215,67	52,55	
206	c-1-2	1	2	5	3,68	203,70	52,22	
207	c-1-2	1	2	5	3,34	204,40	48,55	
208	t-1-2	1	2	5	3,77	204,72	47,96	
209	t-1-2	1	2	5	3,69	205,49	50,93	
210	t-1-2	1	2	5	3,40	202,34	49,05	
211	t-2-2	1	2	5	3,58	206,07	48,04	
212	t-2-2	1	2	5	3,86	205,05	45,38	
213	t-2-2	1	2	5	3,48	207,22	47,67	
214	t-3-2	1	2	5	3,28	211,17	48,19	
215	t-3-2	1	2	5	1,89	206,45	49,84	
216	t-3-2	1	2	5	3,04	207,26	49,76	
217	c-1-3A	1	2	5	6,15	5,10	75,34	13,40
218	c-1-3A	1	2	5	6,13	5,70	74,22	13,95

219	c-1-3A	1	2	5	6,19	6,55	72,52	14,74
220	c-1-3B	1	2	5	47,76	10,98	25,12	16,14
221	c-1-3B	1	2	5	46,67	11,90	25,93	15,50
222	c-1-3B	1	2	5	48,71	13,19	22,20	15,90
223	t-1-3A	1	2	5	1,21	2,32	84,35	12,12
224	t-1-3A	1	2	5	1,56	2,84	82,73	12,86
225	t-1-3A	1	2	5	1,18	2,74	84,03	12,05
226	t-1-3B	1	2	5	34,65	9,69	42,63	13,03
227	t-1-3B	1	2	5	29,81	11,39	40,48	18,33
228	t-1-3B	1	2	5	30,62	10,80	41,62	16,96
229	t-2-3A	1	2	5	2,23	3,16	83,04	11,54
230	t-2-3A	1	2	5	1,95	3,76	84,25	10,04
231	t-2-3A	1	2	5	2,56	3,53	83,04	10,87
232	t-2-3B	1	2	5	27,20	15,28	37,58	19,95
233	t-2-3B	1	2	5	33,75	15,40	33,26	17,59
234	t-2-3B	1	2	5	32,44	15,47	34,18	17,90
235	t-3-3A	1	2	5	3,51	4,59	79,45	12,45
236	t-3-3A	1	2	5	2,98	5,05	80,43	11,55
237	t-3-3A	1	2	5	3,46	5,00	78,00	13,55
238	t-3-3B	1	2	5	34,83	13,56	33,52	18,08
239	t-3-3B	1	2	5	36,27	13,65	32,13	17,94
240	t-3-3B	1	2	5	36,92	15,36	31,06	16,66
241	c-1-1	1	2	6	45,61	30,45	25,83	
242	c-1-1	1	2	6	41,58	32,27	28,14	
243	c-1-1	1	2	6	43,55	30,74	25,48	
244	t-1-1	1	2	6	39,59	35,74	38,12	
245	t-1-1	1	2	6	38,46	34,17	36,51	
246	t-1-1	1	2	6	38,15	35,84	39,25	
247	t-2-1	1	2	6	42,89	32,01	37,42	
248	t-2-1	1	2	6	40,93	30,57	31,47	
249	t-2-1	1	2	6	40,40	31,20	36,75	
250	t-3-1	1	2	6	47,92	35,78	35,76	
251	t-3-1	1	2	6	46,74	35,59	33,23	
252	t-3-1	1	2	6	47,70	33,49	32,32	
253	c-1-2	1	2	6	5,80	244,62	64,93	
254	c-1-2	1	2	6	7,27	248,47	67,80	
255	c-1-2	1	2	6	5,76	246,10	65,55	
256	t-1-2	1	2	6	7,01	246,58	65,64	
257	t-1-2	1	2	6	6,14	247,57	68,74	
258	t-1-2	1	2	6	6,32	247,94	66,19	
259	t-2-2	1	2	6	5,96	247,21	62,06	
260	t-2-2	1	2	6	4,88	246,76	66,33	
261	t-2-2	1	2	6	5,18	246,94	65,38	
262	t-3-2	1	2	6	5,99	244,63	66,96	

263	t-3-2	1	2	6	5,72	245,87	66,26	
264	t-3-2	1	2	6	7,75	250,07	66,57	
265	c-1-3A	1	2	6	1,39	6,83	61,15	30,63
266	c-1-3A	1	2	6	1,55	6,36	64,30	27,79
267	c-1-3A	1	2	6	1,70	7,49	58,54	32,28
268	c-1-3B	1	2	6	20,14	11,56	32,03	36,28
269	c-1-3B	1	2	6	26,93	10,63	32,37	30,06
270	c-1-3B	1	2	6	26,89	11,25	31,51	30,35
271	t-1-3A	1	2	6	1,17	8,81	45,31	44,71
272	t-1-3A	1	2	6	1,11	9,06	42,37	47,46
273	t-1-3A	1	2	6	1,66	9,75	40,02	48,57
274	t-1-3B	1	2	6	25,40	7,49	42,30	24,82
275	t-1-3B	1	2	6	24,02	7,47	41,98	26,53
276	t-1-3B	1	2	6	22,39	8,42	43,12	26,07
277	t-2-3A	1	2	6	1,24	8,34	56,70	33,72
278	t-2-3A	1	2	6	1,17	8,98	52,61	37,24
279	t-2-3A	1	2	6	1,22	8,61	53,65	36,52
280	t-2-3B	1	2	6	21,99	10,88	35,55	31,58
281	t-2-3B	1	2	6	19,62	12,50	33,24	34,65
282	t-2-3B	1	2	6	21,03	12,72	33,71	32,54
283	t-3-3A	1	2	6	1,73	6,85	62,28	29,14
284	t-3-3A	1	2	6	1,43	7,31	60,40	30,85
285	t-3-3A	1	2	6	1,64	6,84	62,21	29,31
286	t-3-3B	1	2	6	19,91	12,92	32,88	34,29
287	t-3-3B	1	2	6	24,99	13,45	32,11	29,46
288	t-3-3B	1	2	6	19,00	11,69	37,33	31,99
289	c-1-1	1	2	7	44,95	45,02	32,48	
290	c-1-1	1	2	7	48,03	41,50	37,90	
291	c-1-1	1	2	7	42,79	38,03	30,02	
292	t-1-1	1	2	7	40,87	41,27	34,32	
293	t-1-1	1	2	7	44,21	41,13	33,31	
294	t-1-1	1	2	7	42,03	40,31	31,71	
295	t-2-1	1	2	7	45,62	36,67	36,42	
296	t-2-1	1	2	7	43,56	32,48	34,90	
297	t-2-1	1	2	7	44,05	34,60	32,40	
298	t-3-1	1	2	7	49,02	37,10	30,49	
299	t-3-1	1	2	7	46,91	38,79	35,77	
300	t-3-1	1	2	7	49,91	37,51	31,96	
301	c-1-2	1	2	7	3,45	248,52	56,89	
302	c-1-2	1	2	7	3,64	256,18	65,49	
303	c-1-2	1	2	7	3,95	258,07	64,32	
304	t-1-2	1	2	7	3,51	252,10	62,06	
305	t-1-2	1	2	7	3,82	247,80	62,27	
306	t-1-2	1	2	7	4,74	264,82	62,14	

307	t-2-2	1	2	7	5,15	251,20	63,64	
308	t-2-2	1	2	7	3,50	261,32	64,93	
309	t-2-2	1	2	7	4,25	250,23	62,57	
310	t-3-2	1	2	7	3,26	255,84	63,78	
311	t-3-2	1	2	7	3,52	249,19	63,07	
312	t-3-2	1	2	7	2,93	246,13	63,60	
313	c-1-3A	1	2	7	1,54	3,64	78,36	16,46
314	c-1-3A	1	2	7	1,44	3,95	77,81	16,80
315	c-1-3A	1	2	7	1,63	4,39	77,68	16,30
316	c-1-3B	1	2	7	37,61	9,44	32,66	20,29
317	c-1-3B	1	2	7	40,34	9,83	29,83	20,00
318	c-1-3B	1	2	7	41,55	10,87	27,92	19,66
319	t-1-3A	1	2	7	0,60	2,27	82,16	14,97
320	t-1-3A	1	2	7	0,83	2,26	82,63	14,28
321	t-1-3A	1	2	7	0,58	2,95	79,41	17,06
322	t-1-3B	1	2	7	17,03	9,01	55,20	18,76
323	t-1-3B	1	2	7	19,31	7,83	56,52	16,34
324	t-1-3B	1	2	7	17,64	8,59	53,22	20,54
325	t-2-3A	1	2	7	0,60	2,60	83,15	13,64
326	t-2-3A	1	2	7	0,61	2,78	84,57	12,03
327	t-2-3A	1	2	7	0,51	2,76	83,93	12,80
328	t-2-3B	1	2	7	22,45	11,22	47,93	18,40
329	t-2-3B	1	2	7	21,89	11,59	47,08	19,44
330	t-2-3B	1	2	7	22,82	12,97	44,26	19,95
331	t-3-3A	1	2	7	0,40	3,92	79,46	16,21
332	t-3-3A	1	2	7	0,65	4,73	80,15	14,46
333	t-3-3A	1	2	7	0,66	4,28	81,58	13,48
334	t-3-3B	1	2	7	23,78	15,68	35,58	24,96
335	t-3-3B	1	2	7	21,73	17,00	35,79	25,48
336	t-3-3B	1	2	7	25,00	17,27	35,56	22,18
337	c-1-1	1	2	8	50,34	51,61	46,04	
338	c-1-1	1	2	8	45,00	45,29	36,33	
339	c-1-1	1	2	8	43,28	46,52	44,15	
340	t-1-1	1	2	8	50,46	38,81	36,50	
341	t-1-1	1	2	8	50,34	39,78	37,71	
342	t-1-1	1	2	8	49,35	39,45	36,91	
343	t-2-1	1	2	8	49,83	42,27	34,92	
344	t-2-1	1	2	8	35,67	35,94	34,89	
345	t-2-1	1	2	8	35,84	31,07	32,44	
346	t-3-1	1	2	8	50,02	47,26	39,19	
347	t-3-1	1	2	8	50,96	42,72	36,99	
348	t-3-1	1	2	8	52,82	50,01	45,12	
349	c-1-2	1	2	8	2,92	227,35	50,44	
350	c-1-2	1	2	8	3,96	236,66	57,29	

351	c-1-2	1	2	8	3,49	231,54	52,30	
352	t-1-2	1	2	8	3,72	235,24	53,26	
353	t-1-2	1	2	8	4,63	238,42	56,20	
354	t-1-2	1	2	8	3,97	235,81	55,40	
355	t-2-2	1	2	8	4,36	233,99	57,10	
356	t-2-2	1	2	8	3,29	231,12	52,68	
357	t-2-2	1	2	8	2,81	229,69	52,09	
358	t-3-2	1	2	8	2,90	229,88	59,89	
359	t-3-2	1	2	8	4,01	234,49	58,68	
360	t-3-2	1	2	8	3,14	234,02	53,26	
361	c-1-3A	1	2	8	1,84	4,08	74,81	19,27
362	c-1-3A	1	2	8	1,84	5,18	71,77	21,22
363	c-1-3A	1	2	8	1,80	5,69	70,93	21,58
364	c-1-3B	1	2	8	25,87	13,45	28,38	32,30
365	c-1-3B	1	2	8	21,23	13,74	29,54	35,49
366	c-1-3B	1	2	8	35,73	13,96	25,67	24,65
367	t-1-3A	1	2	8	0,69	3,83	73,13	22,35
368	t-1-3A	1	2	8	0,83	3,74	75,02	20,41
369	t-1-3A	1	2	8	0,93	4,55	73,88	20,64
370	t-1-3B	1	2	8	35,36	6,86	42,01	15,78
371	t-1-3B	1	2	8	28,39	6,79	45,17	19,65
372	t-1-3B	1	2	8	32,92	7,42	41,44	18,22
373	t-2-3A	1	2	8	0,84	5,01	74,89	19,25
374	t-2-3A	1	2	8	1,26	5,68	71,11	21,95
375	t-2-3A	1	2	8	1,20	5,82	70,62	22,37
376	t-2-3B	1	2	8	24,00	12,07	36,35	27,58
377	t-2-3B	1	2	8	30,06	12,70	32,76	24,47
378	t-2-3B	1	2	8	21,20	14,31	33,49	31,00
379	t-3-3A	1	2	8	1,35	5,53	72,82	20,30
380	t-3-3A	1	2	8	1,36	4,30	75,69	18,65
381	t-3-3A	1	2	8	1,13	4,46	77,35	17,06
382	t-3-3B	1	2	8	19,97	18,34	26,27	35,42
383	t-3-3B	1	2	8	25,60	20,45	25,30	28,65
384	t-3-3B	1	2	8	23,46	19,98	24,21	32,35
385	c-1-1	1	3	9	37,79	35,56	30,36	
386	c-1-1	1	3	9	36,07	34,78	28,07	
387	c-1-1	1	3	9	39,50	37,53	31,05	
388	t-1-1	1	3	9	35,54	33,92	31,57	
389	t-1-1	1	3	9	36,43	37,46	34,09	
390	t-1-1	1	3	9	37,32	34,34	33,10	
391	t-2-1	1	3	9	35,00	34,93	28,62	
392	t-2-1	1	3	9	37,12	36,43	31,06	
393	t-2-1	1	3	9	34,30	33,44	28,69	
394	t-3-1	1	3	9	33,10	34,22	26,52	

395	t-3-1	1	3	9	38,16	35,69	29,58	
396	t-3-1	1	3	9	36,66	34,58	27,72	
397	c-1-2	1	3	9	4,02	261,87	53,57	
398	c-1-2	1	3	9	3,98	247,73	52,90	
399	c-1-2	1	3	9	3,68	251,03	54,36	
400	t-1-2	1	3	9	4,59	252,02	51,31	
401	t-1-2	1	3	9	3,70	248,43	54,09	
402	t-1-2	1	3	9	4,26	244,10	52,77	
403	t-2-2	1	3	9	4,27	242,36	52,75	
404	t-2-2	1	3	9	4,36	242,59	52,46	
405	t-2-2	1	3	9	4,47	245,25	55,06	
406	t-3-2	1	3	9	3,78	240,22	53,71	
407	t-3-2	1	3	9	4,48	241,98	54,61	
408	t-3-2	1	3	9	3,85	238,31	52,22	
409	c-1-3A	1	3	9	1,00	3,54	77,59	17,88
410	c-1-3A	1	3	9	1,08	3,88	76,67	18,37
411	c-1-3A	1	3	9	1,04	3,29	78,31	17,36
412	c-1-3B	1	3	9	45,28	16,16	16,30	22,26
413	c-1-3B	1	3	9	46,99	15,02	14,04	23,95
414	c-1-3B	1	3	9	42,54	17,07	15,88	24,51
415	t-1-3A	1	3	9	0,29	5,13	80,07	14,51
416	t-1-3A	1	3	9	0,50	5,74	78,63	15,14
417	t-1-3A	1	3	9	0,49	7,96	76,23	15,31
418	t-1-3B	1	3	9	21,00	18,89	37,64	22,48
419	t-1-3B	1	3	9	26,07	18,43	35,18	20,32
420	t-1-3B	1	3	9	26,61	18,46	32,58	22,35
421	t-2-3A	1	3	9	0,62	5,05	73,93	20,40
422	t-2-3A	1	3	9	0,73	4,49	77,00	17,78
423	t-2-3A	1	3	9	0,76	6,17	72,07	21,00
424	t-2-3B	1	3	9	24,40	18,51	28,77	28,32
425	t-2-3B	1	3	9	28,63	15,93	28,91	26,53
426	t-2-3B	1	3	9	19,87	21,60	28,36	30,17
427	t-3-3A	1	3	9	1,02	5,60	70,97	22,41
428	t-3-3A	1	3	9	0,70	5,54	70,07	23,69
429	t-3-3A	1	3	9	0,91	5,68	70,49	22,91
430	t-3-3B	1	3	9	29,41	20,55	18,08	31,97
431	t-3-3B	1	3	9	31,68	19,23	18,77	30,31
432	t-3-3B	1	3	9	28,97	22,49	17,62	30,92
433	c-1-1	1	3	10	48,68	38,52	27,56	
434	c-1-1	1	3	10	47,70	43,22	34,46	
435	c-1-1	1	3	10	50,45	40,59	27,16	
436	t-1-1	1	3	10	46,95	36,82	34,26	
437	t-1-1	1	3	10	47,59	36,09	32,66	
438	t-1-1	1	3	10	45,98	35,64	32,07	

439	t-2-1	1	3	10	49,56	39,06	28,03	
440	t-2-1	1	3	10	48,51	36,41	30,23	
441	t-2-1	1	3	10	50,85	37,49	31,54	
442	t-3-1	1	3	10	55,79	42,37	34,97	
443	t-3-1	1	3	10	55,54	38,47	27,16	
444	t-3-1	1	3	10	56,48	42,95	35,41	
445	c-1-2	1	3	10	6,56	277,81	67,42	
446	c-1-2	1	3	10	6,25	259,65	62,95	
447	c-1-2	1	3	10	6,07	256,76	61,87	
448	t-1-2	1	3	10	6,34	251,56	69,21	
449	t-1-2	1	3	10	6,26	258,91	62,58	
450	t-1-2	1	3	10	6,11	256,63	65,59	
451	t-2-2	1	3	10	6,34	248,15	65,14	
452	t-2-2	1	3	10	5,66	253,00	66,89	
453	t-2-2	1	3	10	6,24	250,37	66,16	
454	t-3-2	1	3	10	6,07	246,80	65,35	
455	t-3-2	1	3	10	5,69	249,44	68,67	
456	t-3-2	1	3	10	5,37	248,21	63,96	
457	c-1-3A	1	3	10	1,32	4,13	76,00	18,55
458	c-1-3A	1	3	10	1,54	4,05	72,46	21,96
459	c-1-3A	1	3	10	1,28	4,83	70,02	23,88
460	c-1-3B	1	3	10	28,40	13,99	25,78	31,83
461	c-1-3B	1	3	10	42,01	12,55	21,69	23,75
462	c-1-3B	1	3	10	39,02	13,51	21,47	26,01
463	t-1-3A	1	3	10	1,00	4,10	68,69	26,21
464	t-1-3A	1	3	10	0,87	3,92	71,19	24,02
465	t-1-3A	1	3	10	1,44	5,53	66,27	26,77
466	t-1-3B	1	3	10	29,51	12,01	36,71	21,77
467	t-1-3B	1	3	10	29,50	10,52	38,98	21,00
468	t-1-3B	1	3	10	31,07	12,33	33,69	22,91
469	t-2-3A	1	3	10	1,20	4,59	71,46	22,76
470	t-2-3A	1	3	10	1,46	5,19	70,75	22,59
471	t-2-3A	1	3	10	0,94	4,84	72,54	21,68
472	t-2-3B	1	3	10	26,45	13,95	33,26	26,34
473	t-2-3B	1	3	10	30,00	15,83	30,30	23,87
474	t-2-3B	1	3	10	24,88	15,23	33,24	26,65
475	t-3-3A	1	3	10	1,57	4,99	74,06	19,38
476	t-3-3A	1	3	10	1,41	4,72	76,09	17,79
477	t-3-3A	1	3	10	1,24	4,27	77,50	16,98
478	t-3-3B	1	3	10	21,52	17,30	28,86	32,32
479	t-3-3B	1	3	10	31,09	17,08	26,27	25,55
480	t-3-3B	1	3	10	27,50	17,07	28,69	26,74
481	c-1-1	1	3	11	40,32	35,86	36,93	
482	c-1-1	1	3	11	35,37	34,50	32,79	

483	c-1-1	1	3	11	37,87	36,25	35,60	
484	t-1-1	1	3	11	43,10	41,97	44,61	
485	t-1-1	1	3	11	44,25	43,34	44,91	
486	t-1-1	1	3	11	44,29	44,70	45,86	
487	t-2-1	1	3	11	45,40	41,39	42,13	
488	t-2-1	1	3	11	42,79	37,35	38,39	
489	t-2-1	1	3	11	44,35	41,82	36,25	
490	t-3-1	1	3	11	42,25	41,58	37,01	
491	t-3-1	1	3	11	38,70	40,18	36,71	
492	t-3-1	1	3	11	41,25	39,86	32,92	
493	c-1-2	1	3	11	7,05	226,56	61,23	
494	c-1-2	1	3	11	7,07	215,88	55,87	
495	c-1-2	1	3	11	7,36	215,64	59,29	
496	t-1-2	1	3	11	7,62	209,97	53,68	
497	t-1-2	1	3	11	6,95	219,73	58,11	
498	t-1-2	1	3	11	7,13	219,54	57,48	
499	t-2-2	1	3	11	8,58	230,03	63,08	
500	t-2-2	1	3	11	8,07	226,01	60,18	
501	t-2-2	1	3	11	8,05	218,59	58,70	
502	t-3-2	1	3	11	9,61	222,01	60,33	
503	t-3-2	1	3	11	8,39	224,82	63,71	
504	t-3-2	1	3	11	9,14	215,83	60,91	
505	c-1-3A	1	3	11	1,41	10,72	23,61	64,26
506	c-1-3A	1	3	11	0,90	8,54	35,02	55,54
507	c-1-3A	1	3	11	1,11	7,20	18,65	73,04
508	c-1-3B	1	3	11	13,50	11,43	9,64	65,43
509	c-1-3B	1	3	11	23,07	10,64	12,73	53,55
510	c-1-3B	1	3	11	11,66	10,64	8,39	69,31
511	t-1-3A	1	3	11	0,62	4,37	45,04	49,96
512	t-1-3A	1	3	11	0,70	5,27	48,85	45,19
513	t-1-3A	1	3	11	0,76	3,86	52,81	42,56
514	t-1-3B	1	3	11	22,53	5,13	29,48	42,85
515	t-1-3B	1	3	11	26,83	6,15	30,68	36,34
516	t-1-3B	1	3	11	24,12	6,33	33,01	36,54
517	t-2-3A	1	3	11	1,12	5,61	47,33	45,94
518	t-2-3A	1	3	11	0,90	6,72	48,71	43,67
519	t-2-3A	1	3	11	0,69	6,75	45,37	47,19
520	t-2-3B	1	3	11	27,17	8,48	25,28	39,07
521	t-2-3B	1	3	11	24,43	10,78	20,40	44,39
522	t-2-3B	1	3	11	24,00	9,86	23,60	42,54
523	t-3-3A	1	3	11	1,16	9,71	33,51	55,61
524	t-3-3A	1	3	11	0,09	6,77	27,71	65,43
525	t-3-3A	1	3	11	0,79	10,19	32,23	56,78
526	t-3-3B	1	3	11	24,23	12,16	16,11	47,50

527	t-3-3B	1	3	11	16,99	11,01	14,95	57,04
528	t-3-3B	1	3	11	20,75	12,89	17,91	48,46
529	c-1-1	1	3	12	14,72	11,25	8,80	
530	c-1-1	1	3	12	14,76	11,76	8,99	
531	c-1-1	1	3	12	13,68	12,22	10,07	
532	t-1-1	1	3	12	22,14	23,05	19,99	
533	t-1-1	1	3	12	21,14	24,44	21,67	
534	t-1-1	1	3	12	21,18	23,55	18,25	
535	t-2-1	1	3	12	20,71	19,40	17,23	
536	t-2-1	1	3	12	20,84	20,33	18,06	
537	t-2-1	1	3	12	19,05	19,27	16,50	
538	t-3-1	1	3	12	17,59	18,42	15,15	
539	t-3-1	1	3	12	16,22	16,42	11,95	
540	t-3-1	1	3	12	19,18	18,22	15,62	
541	c-1-2	1	3	12	13,76	279,60	86,85	
542	c-1-2	1	3	12	13,66	276,17	88,32	
543	c-1-2	1	3	12	13,40	253,33	84,10	
544	t-1-2	1	3	12	14,25	258,03	85,50	
545	t-1-2	1	3	12	12,65	249,84	80,58	
546	t-1-2	1	3	12	14,29	248,13	82,89	
547	t-2-2	1	3	12	13,85	246,27	81,98	
548	t-2-2	1	3	12	13,54	246,74	80,96	
549	t-2-2	1	3	12	14,99	291,27	86,74	
550	t-3-2	1	3	12	12,72	265,84	86,87	
551	t-3-2	1	3	12	14,40	256,06	87,25	
552	t-3-2	1	3	12	15,65	257,06	89,68	
553	c-1-3A	1	3	12	2,92	5,09	65,98	26,00
554	c-1-3A	1	3	12	2,78	5,30	65,06	26,86
555	c-1-3A	1	3	12	3,75	6,16	58,89	31,20
556	c-1-3B	1	3	12	43,71	10,75	15,32	30,22
557	c-1-3B	1	3	12	38,81	9,99	20,12	31,08
558	c-1-3B	1	3	12	42,79	10,14	15,34	31,73
559	t-1-3A	1	3	12	1,17	3,98	58,85	35,99
560	t-1-3A	1	3	12	1,15	4,54	56,75	37,56
561	t-1-3A	1	3	12	1,37	4,18	55,35	39,11
562	t-1-3B	1	3	12	25,93	11,71	35,76	26,61
563	t-1-3B	1	3	12	25,89	12,07	35,81	12,07
564	t-1-3B	1	3	12	25,41	11,41	34,67	28,51
565	t-2-3A	1	3	12	0,94	4,84	65,35	28,87
566	t-2-3A	1	3	12	0,94	4,16	69,40	25,50
567	t-2-3A	1	3	12	0,93	4,90	67,71	26,46
568	t-2-3B	1	3	12	30,65	14,37	27,66	27,33
569	t-2-3B	1	3	12	27,48	11,10	33,37	28,04
570	t-2-3B	1	3	12	29,55	14,69	28,19	27,57

571	t-3-3A	1	3	12	1,82	4,95	67,22	26,01
572	t-3-3A	1	3	12	1,91	5,98	63,69	28,42
573	t-3-3A	1	3	12	2,11	5,96	66,61	25,32
574	t-3-3B	1	3	12	35,03	15,49	21,66	27,82
575	t-3-3B	1	3	12	34,52	14,48	22,02	28,99
576	t-3-3B	1	3	12	29,24	15,54	23,93	31,28
577	c-1-1	2	1	1	41,06	41,47	32,76	
578	c-1-1	2	1	1	42,89	41,66	32,51	
579	c-1-1	2	1	1	43,03	41,01	32,88	
580	t-1-1	2	1	1	45,16	44,76	40,16	
581	t-1-1	2	1	1	45,82	47,12	44,68	
582	t-1-1	2	1	1	45,28	46,51	41,58	
583	t-2-1	2	1	1	51,56	48,48	43,15	
584	t-2-1	2	1	1	50,99	48,86	40,49	
585	t-2-1	2	1	1	50,11	49,92	42,16	
586	t-3-1	2	1	1	45,71	42,77	32,30	
587	t-3-1	2	1	1	45,95	40,85	32,52	
588	t-3-1	2	1	1	46,55	45,81	35,93	
589	c-1-2	2	1	1	5,12	252,34	68,90	
590	c-1-2	2	1	1	4,64	242,52	62,93	
591	c-1-2	2	1	1	5,59	246,65	66,08	
592	t-1-2	2	1	1	5,15	247,60	62,93	
593	t-1-2	2	1	1	5,09	243,53	66,73	
594	t-1-2	2	1	1	5,30	243,74	64,88	
595	t-2-2	2	1	1	4,61	243,79	66,33	
596	t-2-2	2	1	1	4,88	247,66	63,72	
597	t-2-2	2	1	1	3,88	242,81	60,09	
598	t-3-2	2	1	1	5,18	242,42	63,84	
599	t-3-2	2	1	1	5,06	239,63	62,75	
600	t-3-2	2	1	1	6,65	260,55	74,72	
601	c-1-3A	2	1	1	1,58	4,76	76,76	16,90
602	c-1-3A	2	1	1	1,78	5,14	76,96	16,12
603	c-1-3A	2	1	1	1,58	5,50	76,17	16,75
604	c-1-3B	2	1	1	42,14	9,86	26,68	21,32
605	c-1-3B	2	1	1	41,98	9,13	28,84	20,05
606	c-1-3B	2	1	1	44,67	10,86	25,67	18,81
607	t-1-3A	2	1	1	0,36	1,66	87,91	10,06
608	t-1-3A	2	1	1	0,46	1,75	86,71	11,08
609	t-1-3A	2	1	1	0,49	1,79	85,93	11,79
610	t-1-3B	2	1	1	20,44	7,67	51,05	20,84
611	t-1-3B	2	1	1	17,39	7,91	52,40	22,30
612	t-1-3B	2	1	1	17,77	8,97	50,56	22,71
613	t-2-3A	2	1	1	0,50	2,35	85,29	11,86
614	t-2-3A	2	1	1	0,71	2,50	85,17	11,62

615	t-2-3A	2	1	1	0,56	2,91	84,17	12,36
616	t-2-3B	2	1	1	21,25	10,01	41,37	27,37
617	t-2-3B	2	1	1	20,93	10,43	40,22	28,42
618	t-2-3B	2	1	1	19,64	12,32	38,20	29,84
619	t-3-3A	2	1	1	0,83	3,62	81,61	13,94
620	t-3-3A	2	1	1	1,11	4,78	78,73	15,39
621	t-3-3A	2	1	1	1,25	4,40	79,80	14,55
622	t-3-3B	2	1	1	34,23	12,63	28,36	24,78
623	t-3-3B	2	1	1	31,98	12,30	30,08	25,65
624	t-3-3B	2	1	1	29,03	14,03	28,50	28,44
625	c-1-1	2	1	2	30,50	28,07	21,81	
626	c-1-1	2	1	2	26,77	28,30	21,35	
627	c-1-1	2	1	2	30,93	26,94	20,70	
628	t-1-1	2	1	2	40,32	39,80	34,72	
629	t-1-1	2	1	2	41,16	40,25	35,23	
630	t-1-1	2	1	2	39,47	38,33	34,91	
631	t-2-1	2	1	2	38,10	36,54	33,28	
632	t-2-1	2	1	2	39,05	35,56	30,23	
633	t-2-1	2	1	2	43,64	38,70	33,80	
634	t-3-1	2	1	2	36,98	35,96	30,19	
635	t-3-1	2	1	2	37,33	31,30	28,55	
636	t-3-1	2	1	2	36,82	33,80	31,24	
637	c-1-2	2	1	2	3,62	260,74	54,99	
638	c-1-2	2	1	2	3,31	239,91	49,41	
639	c-1-2	2	1	2	4,07	240,32	56,17	
640	t-1-2	2	1	2	3,36	242,76	51,67	
641	t-1-2	2	1	2	3,94	237,85	50,17	
642	t-1-2	2	1	2	4,75	240,46	52,07	
643	t-2-2	2	1	2	3,68	245,02	53,57	
644	t-2-2	2	1	2	3,38	245,47	55,18	
645	t-2-2	2	1	2	3,77	246,82	56,61	
646	t-3-2	2	1	2	4,57	246,44	59,05	
647	t-3-2	2	1	2	4,57	244,62	53,65	
648	t-3-2	2	1	2	3,28	242,05	55,40	
649	c-1-3A	2	1	2	1,03	4,85	80,22	13,90
650	c-1-3A	2	1	2	1,51	5,42	78,73	14,34
651	c-1-3A	2	1	2	1,48	5,25	79,61	13,66
652	c-1-3B	2	1	2	23,35	8,53	49,89	18,22
653	c-1-3B	2	1	2	26,63	9,47	44,83	19,07
654	c-1-3B	2	1	2	26,47	9,83	46,51	17,19
655	t-1-3A	2	1	2	0,51	1,77	88,98	8,73
656	t-1-3A	2	1	2	0,63	2,26	88,31	8,80
657	t-1-3A	2	1	2	0,88	2,13	86,53	10,46
658	t-1-3B	2	1	2	17,43	10,40	54,11	18,06

659	t-1-3B	2	1	2	23,25	8,94	52,70	15,10
660	t-1-3B	2	1	2	19,84	9,14	53,29	17,73
661	t-2-3A	2	1	2	0,71	2,74	86,70	9,85
662	t-2-3A	2	1	2	0,93	3,75	85,15	10,17
663	t-2-3A	2	1	2	0,66	2,91	85,84	10,59
664	t-2-3B	2	1	2	21,91	9,85	51,08	17,16
665	t-2-3B	2	1	2	22,19	11,93	48,67	17,21
666	t-2-3B	2	1	2	22,95	12,25	49,18	15,62
667	t-3-3A	2	1	2	1,35	5,23	81,92	11,50
668	t-3-3A	2	1	2	1,29	4,50	83,44	10,77
669	t-3-3A	2	1	2	1,10	5,12	83,10	10,68
670	t-3-3B	2	1	2	23,45	11,35	48,19	17,00
671	t-3-3B	2	1	2	28,43	11,07	46,13	14,37
672	t-3-3B	2	1	2	25,77	13,90	43,32	17,01
673	c-1-1	2	1	3	39,24	31,70	23,38	
674	c-1-1	2	1	3	38,47	33,53	23,77	
675	c-1-1	2	1	3	37,27	38,43	33,99	
676	t-1-1	2	1	3	51,43	47,01	40,29	
677	t-1-1	2	1	3	51,10	46,91	39,36	
678	t-1-1	2	1	3	50,13	48,47	39,71	
679	t-2-1	2	1	3	52,48	50,97	41,46	
680	t-2-1	2	1	3	50,15	43,64	34,71	
681	t-2-1	2	1	3	49,03	43,96	33,88	
682	t-3-1	2	1	3	44,40	40,70	28,63	
683	t-3-1	2	1	3	41,49	35,65	25,97	
684	t-3-1	2	1	3	40,33	36,87	28,04	
685	c-1-2	2	1	3	6,27	251,47	49,45	
686	c-1-2	2	1	3	4,62	245,10	49,42	
687	c-1-2	2	1	3	3,68	246,34	50,82	
688	t-1-2	2	1	3	3,52	254,23	58,40	
689	t-1-2	2	1	3	3,73	259,40	55,77	
690	t-1-2	2	1	3	2,68	251,37	54,23	
691	t-2-2	2	1	3	2,91	260,32	52,90	
692	t-2-2	2	1	3	3,52	259,26	56,22	
693	t-2-2	2	1	3	3,19	254,90	51,22	
694	t-3-2	2	1	3	3,10	249,69	51,81	
695	t-3-2	2	1	3	3,01	255,84	52,77	
696	t-3-2	2	1	3	2,61	256,66	54,98	
697	c-1-3A	2	1	3	3,06	8,16	68,47	20,31
698	c-1-3A	2	1	3	3,83	7,38	69,36	19,43
699	c-1-3A	2	1	3	3,47	7,79	68,75	19,99
700	c-1-3B	2	1	3	24,69	17,33	26,29	31,69
701	c-1-3B	2	1	3	30,04	17,01	24,92	28,02
702	c-1-3B	2	1	3	33,73	16,65	24,09	25,53

703	t-1-3A	2	1	3	0,65	2,07	88,28	9,00
704	t-1-3A	2	1	3	0,84	2,39	86,92	9,85
705	t-1-3A	2	1	3	0,81	2,31	87,80	9,08
706	t-1-3B	2	1	3	11,11	19,20	39,69	29,99
707	t-1-3B	2	1	3	11,30	21,17	33,79	33,74
708	t-1-3B	2	1	3	11,88	17,55	38,54	31,02
709	t-2-3A	2	1	3	0,91	2,36	88,59	8,14
710	t-2-3A	2	1	3	1,20	3,68	87,15	7,97
711	t-2-3A	2	1	3	0,84	2,67	88,10	8,39
712	t-2-3B	2	1	3	13,14	21,06	34,16	31,63
713	t-2-3B	2	1	3	13,67	23,30	32,57	30,45
714	t-2-3B	2	1	3	12,74	22,37	31,14	33,74
715	t-3-3A	2	1	3	1,46	4,47	82,47	11,59
716	t-3-3A	2	1	3	1,68	5,68	81,07	11,57
717	t-3-3A	2	1	3	2,16	4,66	80,14	13,04
718	t-3-3B	2	1	3	21,27	21,71	28,58	28,43
719	t-3-3B	2	1	3	20,64	24,38	27,07	27,91
720	t-3-3B	2	1	3	22,43	20,99	28,50	28,09
721	c-1-1	2	1	4	35,24	35,38	26,67	
722	c-1-1	2	1	4	34,77	36,27	28,35	
723	c-1-1	2	1	4	35,52	34,65	27,78	
724	t-1-1	2	1	4	30,29	29,43	27,61	
725	t-1-1	2	1	4	30,56	29,89	27,94	
726	t-1-1	2	1	4	29,47	30,63	27,46	
727	t-2-1	2	1	4	28,66	26,51	22,99	
728	t-2-1	2	1	4	32,14	29,46	26,00	
729	t-2-1	2	1	4	30,74	28,84	24,50	
730	t-3-1	2	1	4	33,16	31,99	25,93	
731	t-3-1	2	1	4	35,24	36,58	29,03	
732	t-3-1	2	1	4	33,11	31,21	23,95	
733	c-1-2	2	1	4	8,42	256,53	78,16	
734	c-1-2	2	1	4	7,24	240,31	74,29	
735	c-1-2	2	1	4	8,37	241,41	76,34	
736	t-1-2	2	1	4	8,52	246,28	78,40	
737	t-1-2	2	1	4	8,38	238,03	78,20	
738	t-1-2	2	1	4	7,56	239,54	76,19	
739	t-2-2	2	1	4	8,58	241,82	82,39	
740	t-2-2	2	1	4	7,99	246,85	75,82	
741	t-2-2	2	1	4	7,87	238,31	72,10	
742	t-3-2	2	1	4	8,16	250,98	80,76	
743	t-3-2	2	1	4	8,50	242,51	76,71	
744	t-3-2	2	1	4	8,33	247,98	77,71	
745	c-1-3A	2	1	4	2,60	5,53	57,53	34,34
746	c-1-3A	2	1	4	2,96	6,19	58,08	32,76

747	c-1-3A	2	1	4	2,63	6,18	57,32	33,86
748	c-1-3B	2	1	4	30,09	10,34	25,59	33,97
749	c-1-3B	2	1	4	29,18	10,50	27,76	32,57
750	c-1-3B	2	1	4	30,62	10,50	26,33	32,55
751	t-1-3A	2	1	4	0,76	2,94	70,01	26,30
752	t-1-3A	2	1	4	0,94	3,27	70,95	24,84
753	t-1-3A	2	1	4	0,91	3,68	68,51	26,90
754	t-1-3B	2	1	4	15,52	10,71	44,98	28,79
755	t-1-3B	2	1	4	16,60	9,92	48,11	25,37
756	t-1-3B	2	1	4	17,31	12,37	41,77	28,55
757	t-2-3A	2	1	4	0,98	5,25	68,03	25,74
758	t-2-3A	2	1	4	0,82	5,33	68,00	25,85
759	t-2-3A	2	1	4	0,86	5,22	66,87	27,05
760	t-2-3B	2	1	4	19,50	15,47	36,51	28,51
761	t-2-3B	2	1	4	18,53	13,03	38,90	29,53
762	t-2-3B	2	1	4	20,06	14,09	34,77	31,08
763	t-3-3A	2	1	4	1,42	5,36	63,10	30,12
764	t-3-3A	2	1	4	1,57	6,17	67,02	25,24
765	t-3-3A	2	1	4	1,64	6,67	64,20	27,49
766	t-3-3B	2	1	4	23,92	12,46	32,73	30,89
767	t-3-3B	2	1	4	26,97	12,71	33,42	26,90
768	t-3-3B	2	1	4	21,85	14,78	32,40	30,97
769	c-1-1	2	2	5	42,17	42,58	34,94	
770	c-1-1	2	2	5	44,46	44,88	38,80	
771	c-1-1	2	2	5	42,97	42,47	31,40	
772	t-1-1	2	2	5	56,79	55,10	54,34	
773	t-1-1	2	2	5	59,80	56,08	51,51	
774	t-1-1	2	2	5	53,71	56,54	50,76	
775	t-2-1	2	2	5	53,60	49,86	40,47	
776	t-2-1	2	2	5	56,52	52,11	39,99	
777	t-2-1	2	2	5	47,99	46,80	39,86	
778	t-3-1	2	2	5	46,56	48,76	38,28	
779	t-3-1	2	2	5	49,42	50,57	40,12	
780	t-3-1	2	2	5	51,93	45,14	39,07	
781	c-1-2	2	2	5	3,06	252,51	57,83	
782	c-1-2	2	2	5	2,78	233,32	46,16	
783	c-1-2	2	2	5	2,67	231,01	47,88	
784	t-1-2	2	2	5	3,13	232,07	51,49	
785	t-1-2	2	2	5	2,56	239,84	50,30	
786	t-1-2	2	2	5	2,46	236,31	51,06	
787	t-2-2	2	2	5	3,21	231,86	51,36	
788	t-2-2	2	2	5	2,52	231,19	49,66	
789	t-2-2	2	2	5	3,27	233,37	55,59	
790	t-3-2	2	2	5	2,85	229,99	51,10	

791	t-3-2	2	2	5	2,56	230,16	51,13	
792	t-3-2	2	2	5	2,55	236,03	52,87	
793	c-1-3A	2	2	5	5,93	7,62	65,29	21,16
794	c-1-3A	2	2	5	6,09	7,18	64,72	22,01
795	c-1-3A	2	2	5	5,95	7,92	62,93	23,21
796	c-1-3B	2	2	5	41,21	13,23	20,95	24,61
797	c-1-3B	2	2	5	40,09	15,36	18,57	25,97
798	c-1-3B	2	2	5	41,50	13,73	18,69	26,09
799	t-1-3A	2	2	5	1,44	2,45	84,26	11,86
800	t-1-3A	2	2	5	1,40	2,14	84,18	12,29
801	t-1-3A	2	2	5	1,68	2,41	85,37	10,53
802	t-1-3B	2	2	5	29,22	17,71	31,22	21,85
803	t-1-3B	2	2	5	27,14	17,42	30,99	24,44
804	t-1-3B	2	2	5	25,26	18,48	30,26	26,00
805	t-2-3A	2	2	5	2,25	4,65	78,75	14,35
806	t-2-3A	2	2	5	2,35	3,24	81,23	13,18
807	t-2-3A	2	2	5	2,65	4,93	78,16	14,26
808	t-2-3B	2	2	5	29,21	23,18	22,55	25,07
809	t-2-3B	2	2	5	26,81	24,54	23,78	24,87
810	t-2-3B	2	2	5	27,99	23,04	22,03	26,94
811	t-3-3A	2	2	5	3,62	6,30	73,49	16,59
812	t-3-3A	2	2	5	3,14	5,61	75,96	15,30
813	t-3-3A	2	2	5	3,41	6,61	73,32	16,65
814	t-3-3B	2	2	5	34,52	16,68	22,44	23,36
815	t-3-3B	2	2	5	35,43	18,08	24,69	21,80
816	t-3-3B	2	2	5	40,17	15,78	23,71	20,34
817	c-1-1	2	2	6	27,38	19,89	15,23	
818	c-1-1	2	2	6	28,02	21,37	16,36	
819	c-1-1	2	2	6	28,98	21,49	15,57	
820	t-1-1	2	2	6	33,74	29,08	26,69	
821	t-1-1	2	2	6	31,93	26,18	24,65	
822	t-1-1	2	2	6	32,87	27,11	27,28	
823	t-2-1	2	2	6	26,89	20,29	15,22	
824	t-2-1	2	2	6	28,55	21,48	15,55	
825	t-2-1	2	2	6	28,08	22,22	16,63	
826	t-3-1	2	2	6	26,21	19,58	13,89	
827	t-3-1	2	2	6	26,59	18,92	14,78	
828	t-3-1	2	2	6	24,99	19,09	12,09	
829	c-1-2	2	2	6	36,05	284,82	79,98	
830	c-1-2	2	2	6	35,72	268,39	76,79	
831	c-1-2	2	2	6	34,52	269,15	76,99	
832	t-1-2	2	2	6	36,73	278,38	80,79	
833	t-1-2	2	2	6	36,27	283,15	81,64	
834	t-1-2	2	2	6	37,41	276,89	76,91	

835	t-2-2	2	2	6	39,16	283,68	80,98	
836	t-2-2	2	2	6	36,44	279,17	80,68	
837	t-2-2	2	2	6	37,07	281,56	82,19	
838	t-3-2	2	2	6	37,10	276,11	79,41	
839	t-3-2	2	2	6	38,11	283,50	80,72	
840	t-3-2	2	2	6	37,24	285,60	82,90	
841	c-1-3A	2	2	6	0,64	40,09	20,48	38,78
842	c-1-3A	2	2	6	0,53	13,51	25,53	60,42
843	c-1-3A	2	2	6	0,54	11,80	26,33	61,34
844	c-1-3B	2	2	6	11,14	14,87	8,85	65,15
845	c-1-3B	2	2	6	12,46	16,71	8,76	62,07
846	c-1-3B	2	2	6	12,51	14,62	8,59	64,28
847	t-1-3A	2	2	6	0,68	8,23	56,14	34,95
848	t-1-3A	2	2	6	0,43	9,08	56,06	34,44
849	t-1-3A	2	2	6	0,39	7,71	55,63	36,27
850	t-1-3B	2	2	6	19,54	17,78	22,47	40,21
851	t-1-3B	2	2	6	18,06	19,84	20,60	41,50
852	t-1-3B	2	2	6	21,41	16,70	23,32	38,58
853	t-2-3A	2	2	6	0,59	12,63	36,85	49,93
854	t-2-3A	2	2	6	0,66	14,48	34,91	49,96
855	t-2-3A	2	2	6	0,48	14,29	35,09	50,14
856	t-2-3B	2	2	6	12,39	21,27	12,65	53,69
857	t-2-3B	2	2	6	14,64	21,83	11,89	51,65
858	t-2-3B	2	2	6	14,17	21,60	11,65	52,58
859	t-3-3A	2	2	6	0,55	23,64	30,53	45,28
860	t-3-3A	2	2	6	0,71	15,26	32,22	51,81
861	t-3-3A	2	2	6	0,40	17,52	29,27	52,81
862	t-3-3B	2	2	6	13,13	28,58	10,77	47,52
863	t-3-3B	2	2	6	15,93	22,42	10,72	50,92
864	t-3-3B	2	2	6	11,20	24,36	8,80	55,64
865	c-1-1	2	2	7	17,45	14,13	9,45	
866	c-1-1	2	2	7	18,25	12,70	7,64	
867	c-1-1	2	2	7	19,23	12,88	9,88	
868	t-1-1	2	2	7	20,03	15,67	15,11	
869	t-1-1	2	2	7	19,57	15,43	12,87	
870	t-1-1	2	2	7	20,05	13,98	12,30	
871	t-2-1	2	2	7	19,92	9,63	6,30	
872	t-2-1	2	2	7	18,27	11,60	7,54	
873	t-2-1	2	2	7	18,65	15,10	10,74	
874	t-3-1	2	2	7	19,44	12,55	8,10	
875	t-3-1	2	2	7	17,39	11,40	5,23	
876	t-3-1	2	2	7	16,94	10,78	5,66	
877	c-1-2	2	2	7	5,21	277,80	66,42	
878	c-1-2	2	2	7	5,69	268,46	70,42	

879	c-1-2	2	2	7	4,90	267,54	70,07	
880	t-1-2	2	2	7	6,09	261,47	64,97	
881	t-1-2	2	2	7	6,34	265,39	65,91	
882	t-1-2	2	2	7	5,95	264,85	67,38	
883	t-2-2	2	2	7	5,31	262,44	65,80	
884	t-2-2	2	2	7	6,32	261,12	67,64	
885	t-2-2	2	2	7	5,00	262,73	64,00	
886	t-3-2	2	2	7	4,41	269,51	65,84	
887	t-3-2	2	2	7	5,44	267,11	67,72	
888	t-3-2	2	2	7	5,58	267,56	66,80	
889	c-1-3A	2	2	7	0,99	6,57	48,04	44,41
890	c-1-3A	2	2	7	0,80	8,18	42,49	48,53
891	c-1-3A	2	2	7	0,93	7,52	43,68	47,86
892	c-1-3B	2	2	7	24,06	12,92	15,85	47,17
893	c-1-3B	2	2	7	20,38	14,93	15,41	49,28
894	c-1-3B	2	2	7	25,46	14,23	15,27	45,04
895	t-1-3A	2	2	7	0,45	6,44	57,32	35,79
896	t-1-3A	2	2	7	0,56	7,77	51,24	40,42
897	t-1-3A	2	2	7	0,75	8,16	52,53	38,56
898	t-1-3B	2	2	7	9,46	12,71	35,80	42,03
899	t-1-3B	2	2	7	11,83	17,22	27,63	43,32
900	t-1-3B	2	2	7	9,40	16,03	29,26	45,31
901	t-2-3A	2	2	7	0,49	13,74	33,97	51,80
902	t-2-3A	2	2	7	0,73	11,84	38,74	48,69
903	t-2-3A	2	2	7	0,92	9,12	45,73	44,23
904	t-2-3B	2	2	7	8,88	22,12	15,25	53,75
905	t-2-3B	2	2	7	9,90	18,49	17,64	53,97
906	t-2-3B	2	2	7	16,25	16,34	21,38	46,03
907	t-3-3A	2	2	7	0,86	17,16	34,18	47,79
908	t-3-3A	2	2	7	0,87	10,87	36,64	51,61
909	t-3-3A	2	2	7	0,92	11,12	35,47	52,50
910	t-3-3B	2	2	7	12,14	24,51	15,97	47,39
911	t-3-3B	2	2	7	12,53	17,49	15,50	54,48
912	t-3-3B	2	2	7	8,96	19,07	14,73	57,24
913	c-1-1	2	2	8	13,52	11,76	11,74	
914	c-1-1	2	2	8	13,87	17,54	19,28	
915	c-1-1	2	2	8	14,78	11,18	10,86	
916	t-1-1	2	2	8	17,39	12,18	11,88	
917	t-1-1	2	2	8	17,38	13,59	12,45	
918	t-1-1	2	2	8	18,42	14,29	18,39	
919	t-2-1	2	2	8	14,79	10,76	8,34	
920	t-2-1	2	2	8	16,60	11,34	8,27	
921	t-2-1	2	2	8	15,80	13,57	11,52	
922	t-3-1	2	2	8	11,91	11,95	6,60	

923	t-3-1	2	2	8	13,24	12,82	9,14	
924	t-3-1	2	2	8	12,50	11,74	11,32	
925	c-1-2	2	2	8	6,75	313,69	74,10	
926	c-1-2	2	2	8	6,84	328,11	75,74	
927	c-1-2	2	2	8	6,85	328,55	68,43	
928	t-1-2	2	2	8	6,18	322,79	75,68	
929	t-1-2	2	2	8	6,35	321,33	69,49	
930	t-1-2	2	2	8	7,35	331,52	75,47	
931	t-2-2	2	2	8	8,45	325,29	71,67	
932	t-2-2	2	2	8	5,35	332,78	73,49	
933	t-2-2	2	2	8	6,11	336,66	74,61	
934	t-3-2	2	2	8	5,55	328,05	74,41	
935	t-3-2	2	2	8	5,46	324,43	70,13	
936	t-3-2	2	2	8	5,01	322,37	75,62	
937	c-1-3A	2	2	8	0,93	18,69	57,94	22,43
938	c-1-3A	2	2	8	0,46	23,01	28,02	48,52
939	c-1-3A	2	2	8	1,22	16,67	32,52	49,59
940	c-1-3B	2	2	8	16,43	24,93	16,15	42,49
941	c-1-3B	2	2	8	17,03	17,96	17,96	47,06
942	c-1-3B	2	2	8	23,50	17,03	21,82	37,65
943	t-1-3A	2	2	8	1,82	12,84	51,41	33,93
944	t-1-3A	2	2	8	1,61	12,33	53,91	32,14
945	t-1-3A	2	2	8	1,90	15,18	48,51	34,41
946	t-1-3B	2	2	8	28,42	16,68	22,33	32,57
947	t-1-3B	2	2	8	30,79	15,47	22,18	31,56
948	t-1-3B	2	2	8	29,36	16,97	25,29	28,38
949	t-2-3A	2	2	8	1,54	17,91	41,47	39,09
950	t-2-3A	2	2	8	1,47	14,69	41,67	42,16
951	t-2-3A	2	2	8	1,74	38,39	33,80	26,06
952	t-2-3B	2	2	8	22,30	21,24	19,85	36,62
953	t-2-3B	2	2	8	24,50	19,98	17,38	38,14
954	t-2-3B	2	2	8	17,69	39,45	16,71	26,14
955	t-3-3A	2	2	8	1,23	34,62	29,09	35,06
956	t-3-3A	2	2	8	1,40	22,59	36,41	39,59
957	t-3-3A	2	2	8	1,22	39,55	27,50	31,73
958	t-3-3B	2	2	8	14,99	35,41	16,11	33,50
959	t-3-3B	2	2	8	18,24	25,14	24,54	32,08
960	t-3-3B	2	2	8	13,88	37,24	18,81	30,07
961	c-1-1	2	3	9	47,54	46,24	43,22	
962	c-1-1	2	3	9	47,75	49,73	45,60	
963	c-1-1	2	3	9	48,73	49,09	44,59	
964	t-1-1	2	3	9	51,93	50,31	50,33	
965	t-1-1	2	3	9	51,80	50,23	50,14	
966	t-1-1	2	3	9	53,95	51,83	52,50	

967	t-2-1	2	3	9	47,19	47,60	42,76	
968	t-2-1	2	3	9	49,44	47,63	43,99	
969	t-2-1	2	3	9	49,60	47,20	43,05	
970	t-3-1	2	3	9	46,56	46,11	42,37	
971	t-3-1	2	3	9	46,33	44,48	40,99	
972	t-3-1	2	3	9	45,10	45,09	38,39	
973	c-1-2	2	3	9	5,17	248,25	54,90	
974	c-1-2	2	3	9	4,22	231,36	50,74	
975	c-1-2	2	3	9	4,54	239,75	50,71	
976	t-1-2	2	3	9	5,86	252,60	54,80	
977	t-1-2	2	3	9	4,55	240,72	52,91	
978	t-1-2	2	3	9	5,53	242,99	54,07	
979	t-2-2	2	3	9	4,91	253,78	58,42	
980	t-2-2	2	3	9	4,52	245,73	54,98	
981	t-2-2	2	3	9	4,78	246,74	56,89	
982	t-3-2	2	3	9	5,02	246,77	56,90	
983	t-3-2	2	3	9	5,34	247,10	59,37	
984	t-3-2	2	3	9	4,39	243,99	53,56	
985	c-1-3A	2	3	9	0,86	4,23	61,35	33,56
986	c-1-3A	2	3	9	1,15	4,56	59,79	34,50
987	c-1-3A	2	3	9	0,84	3,93	64,59	30,64
988	c-1-3B	2	3	9	33,91	13,11	15,95	37,03
989	c-1-3B	2	3	9	33,63	13,87	15,10	37,40
990	c-1-3B	2	3	9	33,31	15,59	15,53	35,57
991	t-1-3A	2	3	9	0,30	3,12	76,93	19,65
992	t-1-3A	2	3	9	0,46	3,16	74,59	21,80
993	t-1-3A	2	3	9	0,38	2,93	73,71	22,97
994	t-1-3B	2	3	9	26,94	16,12	28,99	27,95
995	t-1-3B	2	3	9	27,52	15,99	29,28	27,21
996	t-1-3B	2	3	9	25,00	18,09	27,85	29,05
997	t-2-3A	2	3	9	0,51	4,21	70,81	24,47
998	t-2-3A	2	3	9	0,36	3,24	73,68	22,73
999	t-2-3A	2	3	9	0,47	4,42	69,91	25,21
1000	t-2-3B	2	3	9	20,20	24,74	22,47	32,59
1001	t-2-3B	2	3	9	23,44	23,20	21,17	32,19
1002	t-2-3B	2	3	9	21,68	22,01	21,92	34,39
1003	t-3-3A	2	3	9	0,59	4,02	72,13	23,25
1004	t-3-3A	2	3	9	0,61	6,43	61,06	31,90
1005	t-3-3A	2	3	9	0,64	6,67	60,14	32,55
1006	t-3-3B	2	3	9	24,83	22,41	20,50	32,27
1007	t-3-3B	2	3	9	24,07	21,09	16,83	38,01
1008	t-3-3B	2	3	9	19,08	25,54	17,51	37,87
1009	c-1-1	2	3	10	32,74	34,52	25,70	
1010	c-1-1	2	3	10	36,54	34,43	29,56	

1011	c-1-1	2	3	10	34,93	32,32	23,81	
1012	t-1-1	2	3	10	43,88	41,93	34,04	
1013	t-1-1	2	3	10	44,89	41,04	34,03	
1014	t-1-1	2	3	10	44,23	40,53	36,22	
1015	t-2-1	2	3	10	47,20	39,08	28,09	
1016	t-2-1	2	3	10	49,43	41,88	29,92	
1017	t-2-1	2	3	10	45,80	41,74	29,26	
1018	t-3-1	2	3	10	38,82	37,17	28,16	
1019	t-3-1	2	3	10	41,61	38,97	29,35	
1020	t-3-1	2	3	10	37,79	36,60	27,75	
1021	c-1-2	2	3	10	6,13	249,44	65,74	
1022	c-1-2	2	3	10	6,99	237,04	65,28	
1023	c-1-2	2	3	10	6,49	236,83	66,37	
1024	t-1-2	2	3	10	5,33	239,97	60,34	
1025	t-1-2	2	3	10	6,10	242,51	63,37	
1026	t-1-2	2	3	10	5,19	251,30	64,60	
1027	t-2-2	2	3	10	5,50	246,76	62,97	
1028	t-2-2	2	3	10	4,99	238,13	59,76	
1029	t-2-2	2	3	10	5,59	242,39	64,43	
1030	t-3-2	2	3	10	4,93	246,46	66,99	
1031	t-3-2	2	3	10	5,39	248,41	67,33	
1032	t-3-2	2	3	10	5,18	243,56	65,25	
1033	c-1-3A	2	3	10	1,17	5,74	59,87	33,22
1034	c-1-3A	2	3	10	1,41	5,30	61,69	31,60
1035	c-1-3A	2	3	10	1,56	6,76	56,55	35,13
1036	c-1-3B	2	3	10	32,99	13,80	22,88	30,34
1037	c-1-3B	2	3	10	37,69	14,24	19,93	28,14
1038	c-1-3B	2	3	10	36,70	14,11	19,91	29,27
1039	t-1-3A	2	3	10	1,01	3,06	74,11	21,82
1040	t-1-3A	2	3	10	1,13	3,17	74,53	21,17
1041	t-1-3A	2	3	10	1,30	3,65	72,28	22,78
1042	t-1-3B	2	3	10	23,29	13,93	39,10	23,69
1043	t-1-3B	2	3	10	22,06	16,28	38,39	23,27
1044	t-1-3B	2	3	10	19,52	15,65	38,32	26,51
1045	t-2-3A	2	3	10	0,88	3,71	74,38	21,03
1046	t-2-3A	2	3	10	0,78	3,90	75,04	20,28
1047	t-2-3A	2	3	10	1,21	4,55	74,08	20,17
1048	t-2-3B	2	3	10	21,92	19,57	32,25	26,26
1049	t-2-3B	2	3	10	21,76	17,94	32,67	27,62
1050	t-2-3B	2	3	10	27,41	20,73	27,96	23,90
1051	t-3-3A	2	3	10	1,14	4,76	70,55	23,55
1052	t-3-3A	2	3	10	1,12	4,67	71,07	23,14
1053	t-3-3A	2	3	10	1,23	5,62	69,76	23,40
1054	t-3-3B	2	3	10	24,71	19,91	24,65	30,74

1055	t-3-3B	2	3	10	31,45	19,32	21,19	28,04
1056	t-3-3B	2	3	10	24,26	21,12	24,20	30,42
1057	c-1-1	2	3	11	29,22	28,59	28,05	
1058	c-1-1	2	3	11	27,77	26,14	24,42	
1059	c-1-1	2	3	11	29,19	26,43	22,94	
1060	t-1-1	2	3	11	33,03	31,82	30,56	
1061	t-1-1	2	3	11	33,15	32,66	32,63	
1062	t-1-1	2	3	11	34,95	33,95	32,62	
1063	t-2-1	2	3	11	32,83	29,92	27,85	
1064	t-2-1	2	3	11	31,84	32,01	29,43	
1065	t-2-1	2	3	11	32,01	30,80	28,26	
1066	t-3-1	2	3	11	29,99	27,11	23,02	
1067	t-3-1	2	3	11	31,07	29,76	27,31	
1068	t-3-1	2	3	11	29,66	27,38	23,72	
1069	c-1-2	2	3	11	7,79	271,58	72,07	
1070	c-1-2	2	3	11	7,60	261,15	74,47	
1071	c-1-2	2	3	11	10,41	260,15	71,98	
1072	t-1-2	2	3	11	9,59	260,62	73,26	
1073	t-1-2	2	3	11	11,19	259,18	72,86	
1074	t-1-2	2	3	11	9,55	258,37	75,26	
1075	t-2-2	2	3	11	11,07	254,19	71,15	
1076	t-2-2	2	3	11	7,94	264,48	76,09	
1077	t-2-2	2	3	11	8,49	259,87	75,53	
1078	t-3-2	2	3	11	9,22	262,72	79,37	
1079	t-3-2	2	3	11	7,85	267,28	78,99	
1080	t-3-2	2	3	11	8,03	253,03	72,31	
1081	c-1-3A	2	3	11	0,87	10,98	24,33	63,82
1082	c-1-3A	2	3	11	0,93	12,59	24,20	62,29
1083	c-1-3A	2	3	11	0,92	13,19	23,80	62,09
1084	c-1-3B	2	3	11	15,21	12,54	11,20	61,04
1085	c-1-3B	2	3	11	13,96	14,79	10,03	61,23
1086	c-1-3B	2	3	11	13,81	14,63	10,73	60,84
1087	t-1-3A	2	3	11	0,64	5,40	45,07	48,89
1088	t-1-3A	2	3	11	0,64	5,27	41,65	52,44
1089	t-1-3A	2	3	11	0,51	5,33	44,74	49,42
1090	t-1-3B	2	3	11	8,25	9,83	29,96	51,95
1091	t-1-3B	2	3	11	11,61	8,72	29,52	50,15
1092	t-1-3B	2	3	11	8,77	8,54	29,73	52,96
1093	t-2-3A	2	3	11	0,86	7,48	42,16	49,50
1094	t-2-3A	2	3	11	1,19	10,72	52,19	35,90
1095	t-2-3A	2	3	11	0,74	6,81	43,39	49,06
1096	t-2-3B	2	3	11	13,60	11,72	21,53	53,14
1097	t-2-3B	2	3	11	16,37	15,41	27,49	40,73
1098	t-2-3B	2	3	11	11,84	12,56	23,41	52,19

1099	t-3-3A	2	3	11	0,91	9,95	34,08	55,07
1100	t-3-3A	2	3	11	1,04	10,83	35,23	52,90
1101	t-3-3A	2	3	11	0,88	10,72	32,88	55,52
1102	t-3-3B	2	3	11	13,47	16,06	14,79	55,68
1103	t-3-3B	2	3	11	14,64	14,70	16,02	54,64
1104	t-3-3B	2	3	11	11,18	14,52	17,59	56,72
1105	c-1-1	2	3	12	13,37	11,76	11,06	
1106	c-1-1	2	3	12	12,56	11,60	10,81	
1107	c-1-1	2	3	12	14,74	12,91	12,44	
1108	t-1-1	2	3	12	22,53	22,78	20,36	
1109	t-1-1	2	3	12	22,10	23,34	21,79	
1110	t-1-1	2	3	12	22,16	21,81	22,68	
1111	t-2-1	2	3	12	14,28	15,46	13,16	
1112	t-2-1	2	3	12	16,07	15,34	13,44	
1113	t-2-1	2	3	12	15,56	13,34	12,28	
1114	t-3-1	2	3	12	14,29	13,85	11,21	
1115	t-3-1	2	3	12	12,68	11,88	10,34	
1116	t-3-1	2	3	12	12,33	12,59	9,83	
1117	c-1-2	2	3	12	6,74	261,74	67,25	
1118	c-1-2	2	3	12	7,19	259,59	71,24	
1119	c-1-2	2	3	12	7,24	253,87	69,75	
1120	t-1-2	2	3	12	6,95	255,85	67,26	
1121	t-1-2	2	3	12	8,26	249,86	67,59	
1122	t-1-2	2	3	12	7,01	254,59	67,51	
1123	t-2-2	2	3	12	6,69	252,47	64,96	
1124	t-2-2	2	3	12	7,15	252,35	66,26	
1125	t-2-2	2	3	12	7,18	250,29	66,92	
1126	t-3-2	2	3	12	7,68	251,46	67,01	
1127	t-3-2	2	3	12	7,90	253,56	68,12	
1128	t-3-2	2	3	12	6,55	256,18	68,41	
1129	c-1-3A	2	3	12	0,83	7,45	53,90	37,81
1130	c-1-3A	2	3	12	0,94	7,69	51,46	39,90
1131	c-1-3A	2	3	12	0,95	8,05	50,63	40,38
1132	c-1-3B	2	3	12	25,15	12,07	16,23	46,55
1133	c-1-3B	2	3	12	23,23	12,96	15,66	48,16
1134	c-1-3B	2	3	12	27,96	12,15	14,21	45,68
1135	t-1-3A	2	3	12	0,52	5,13	67,05	27,30
1136	t-1-3A	2	3	12	0,44	4,29	70,94	24,33
1137	t-1-3A	2	3	12	0,45	5,89	60,70	32,96
1138	t-1-3B	2	3	12	20,98	11,30	35,13	32,59
1139	t-1-3B	2	3	12	21,02	11,81	33,99	33,19
1140	t-1-3B	2	3	12	21,88	11,55	31,58	34,99
1141	t-2-3A	2	3	12	0,38	7,44	57,33	34,85
1142	t-2-3A	2	3	12	0,63	7,44	59,72	32,21

1143	t-2-3A	2	3	12	0,56	8,02	58,64	32,78
1144	t-2-3B	2	3	12	19,71	16,59	22,53	41,17
1145	t-2-3B	2	3	12	19,95	16,60	22,59	40,86
1146	t-2-3B	2	3	12	18,94	17,31	22,12	41,64
1147	t-3-3A	2	3	12	0,46	6,92	47,03	45,60
1148	t-3-3A	2	3	12	0,53	9,14	51,41	38,92
1149	t-3-3A	2	3	12	0,79	12,97	48,36	37,89
1150	t-3-3B	2	3	12	17,19	13,76	17,04	52,01
1151	t-3-3B	2	3	12	21,14	16,22	17,83	44,82
1152	t-3-3B	2	3	12	16,59	21,31	16,49	45,61
1153	c-1-1	3	1	1	31,85	20,51	15,44	
1154	c-1-1	3	1	1	33,86	23,80	17,01	
1155	c-1-1	3	1	1	26,19	16,38	11,28	
1156	t-1-1	3	1	1	37,07	30,60	33,81	
1157	t-1-1	3	1	1	36,45	30,33	31,61	
1158	t-1-1	3	1	1	36,32	26,62	29,63	
1159	t-2-1	3	1	1	39,63	27,34	28,65	
1160	t-2-1	3	1	1	40,78	27,94	27,11	
1161	t-2-1	3	1	1	39,50	26,59	28,40	
1162	t-3-1	3	1	1	37,51	24,00	19,42	
1163	t-3-1	3	1	1	36,30	22,68	18,67	
1164	t-3-1	3	1	1	37,85	24,64	20,24	
1165	c-1-2	3	1	1	3,79	270,38	58,77	
1166	c-1-2	3	1	1	3,75	257,03	55,82	
1167	c-1-2	3	1	1	4,03	257,93	56,86	
1168	t-1-2	3	1	1	4,02	258,23	53,72	
1169	t-1-2	3	1	1	4,14	264,91	54,31	
1170	t-1-2	3	1	1	3,72	259,79	57,81	
1171	t-2-2	3	1	1	2,98	257,11	49,98	
1172	t-2-2	3	1	1	3,73	266,15	54,88	
1173	t-2-2	3	1	1	3,88	263,90	53,47	
1174	t-3-2	3	1	1	3,10	254,14	47,87	
1175	t-3-2	3	1	1	2,92	253,81	49,15	
1176	t-3-2	3	1	1	3,14	262,58	53,84	
1177	c-1-3A	3	1	1	3,40	10,07	51,99	34,53
1178	c-1-3A	3	1	1	3,53	17,09	47,53	31,85
1179	c-1-3A	3	1	1	3,70	10,74	49,47	36,08
1180	c-1-3B	3	1	1	36,51	19,75	9,17	34,58
1181	c-1-3B	3	1	1	33,52	25,86	7,39	33,23
1182	c-1-3B	3	1	1	34,57	20,00	8,62	36,81
1183	t-1-3A	3	1	1	1,31	2,85	85,97	9,87
1184	t-1-3A	3	1	1	1,05	2,65	86,31	9,99
1185	t-1-3A	3	1	1	1,08	3,37	84,90	10,65
1186	t-1-3B	3	1	1	38,80	11,02	32,39	17,80

1187	t-1-3B	3	1	1	36,57	12,68	33,24	17,51
1188	t-1-3B	3	1	1	38,32	13,81	28,88	18,99
1189	t-2-3A	3	1	1	2,84	4,21	81,13	11,82
1190	t-2-3A	3	1	1	2,43	5,54	78,91	13,12
1191	t-2-3A	3	1	1	2,70	4,90	79,38	13,01
1192	t-2-3B	3	1	1	37,44	16,55	24,45	21,57
1193	t-2-3B	3	1	1	36,68	16,75	24,01	22,56
1194	t-2-3B	3	1	1	37,16	17,22	24,75	20,87
1195	t-3-3A	3	1	1	3,95	9,98	63,17	22,90
1196	t-3-3A	3	1	1	3,71	8,65	66,34	21,30
1197	t-3-3A	3	1	1	4,32	9,23	66,02	20,42
1198	t-3-3B	3	1	1	34,66	20,60	15,36	29,38
1199	t-3-3B	3	1	1	37,28	20,53	15,42	26,77
1200	t-3-3B	3	1	1	38,57	18,42	17,70	25,31
1201	c-1-1	3	1	2	27,31	23,87	15,16	
1202	c-1-1	3	1	2	24,65	19,08	13,06	
1203	c-1-1	3	1	2	22,43	19,70	12,96	
1204	t-1-1	3	1	2	28,86	27,70	24,36	
1205	t-1-1	3	1	2	27,64	27,34	24,19	
1206	t-1-1	3	1	2	28,59	27,02	25,44	
1207	t-2-1	3	1	2	36,79	31,25	26,84	
1208	t-2-1	3	1	2	37,46	32,90	28,14	
1209	t-2-1	3	1	2	35,13	31,17	24,67	
1210	t-3-1	3	1	2	30,89	23,18	16,01	
1211	t-3-1	3	1	2	32,20	23,97	18,05	
1212	t-3-1	3	1	2	30,81	24,11	17,51	
1213	c-1-2	3	1	2	5,22	267,59	55,31	
1214	c-1-2	3	1	2	5,65	275,55	60,10	
1215	c-1-2	3	1	2	5,97	277,39	62,77	
1216	t-1-2	3	1	2	4,79	275,85	57,82	
1217	t-1-2	3	1	2	5,26	269,55	54,93	
1218	t-1-2	3	1	2	3,88	270,90	59,05	
1219	t-2-2	3	1	2	4,21	272,54	55,86	
1220	t-2-2	3	1	2	5,32	271,82	59,49	
1221	t-2-2	3	1	2	4,93	269,69	55,84	
1222	t-3-2	3	1	2	5,12	266,83	58,46	
1223	t-3-2	3	1	2	5,49	278,54	61,02	
1224	t-3-2	3	1	2	4,59	269,92	57,28	
1225	c-1-3A	3	1	2	1,83	8,72	66,54	22,92
1226	c-1-3A	3	1	2	2,18	7,76	66,25	23,80
1227	c-1-3A	3	1	2	1,25	8,24	67,30	23,20
1228	c-1-3B	3	1	2	23,00	14,69	35,38	26,93
1229	c-1-3B	3	1	2	19,09	17,86	31,32	31,74
1230	c-1-3B	3	1	2	20,30	18,21	30,30	31,19

1231	t-1-3A	3	1	2	0,61	3,22	83,63	12,54
1232	t-1-3A	3	1	2	0,67	4,24	80,26	14,83
1233	t-1-3A	3	1	2	0,71	2,72	84,14	12,43
1234	t-1-3B	3	1	2	19,36	17,37	37,12	26,16
1235	t-1-3B	3	1	2	17,40	21,05	33,15	28,40
1236	t-1-3B	3	1	2	16,52	18,40	34,18	30,90
1237	t-2-3A	3	1	2	0,82	5,06	80,83	13,29
1238	t-2-3A	3	1	2	0,65	5,80	79,77	13,79
1239	t-2-3A	3	1	2	0,69	6,04	79,99	13,28
1240	t-2-3B	3	1	2	16,55	21,81	32,23	29,41
1241	t-2-3B	3	1	2	17,68	22,04	33,41	26,86
1242	t-2-3B	3	1	2	16,96	22,46	32,12	28,46
1243	t-3-3A	3	1	2	0,99	7,31	73,47	18,23
1244	t-3-3A	3	1	2	1,01	7,05	75,43	16,51
1245	t-3-3A	3	1	2	0,92	6,92	75,38	16,79
1246	t-3-3B	3	1	2	17,19	24,32	28,95	29,54
1247	t-3-3B	3	1	2	19,21	21,51	31,80	27,48
1248	t-3-3B	3	1	2	18,65	22,34	31,73	27,28
1249	c-1-1	3	1	3	36,79	35,57	23,30	
1250	c-1-1	3	1	3	37,97	38,62	30,66	
1251	c-1-1	3	1	3	41,86	36,69	28,04	
1252	t-1-1	3	1	3	43,66	43,26	33,73	
1253	t-1-1	3	1	3	42,66	41,63	32,39	
1254	t-1-1	3	1	3	40,93	39,23	33,05	
1255	t-2-1	3	1	3	53,30	42,63	31,75	
1256	t-2-1	3	1	3	53,81	50,67	38,53	
1257	t-2-1	3	1	3	52,87	47,34	34,52	
1258	t-3-1	3	1	3	40,36	32,09	23,25	
1259	t-3-1	3	1	3	41,69	38,99	26,63	
1260	t-3-1	3	1	3	40,06	35,65	25,55	
1261	c-1-2	3	1	3	2,46	293,18	56,02	
1262	c-1-2	3	1	3	2,84	283,62	55,33	
1263	c-1-2	3	1	3	3,37	277,23	56,14	
1264	t-1-2	3	1	3	2,97	273,98	59,94	
1265	t-1-2	3	1	3	4,97	274,47	76,31	
1266	t-1-2	3	1	3	2,78	267,86	52,47	
1267	t-2-2	3	1	3	2,59	272,39	54,11	
1268	t-2-2	3	1	3	3,03	266,00	56,42	
1269	t-2-2	3	1	3	2,97	267,64	54,13	
1270	t-3-2	3	1	3	2,65	265,24	55,76	
1271	t-3-2	3	1	3	2,89	263,11	55,85	
1272	t-3-2	3	1	3	2,63	264,35	50,32	
1273	c-1-3A	3	1	3	2,71	5,18	79,45	12,66
1274	c-1-3A	3	1	3	2,70	4,88	78,41	14,02

1275	c-1-3A	3	1	3	2,58	5,85	77,10	14,46
1276	c-1-3B	3	1	3	38,48	12,71	29,19	19,62
1277	c-1-3B	3	1	3	38,05	11,86	29,29	20,79
1278	c-1-3B	3	1	3	38,01	13,04	29,94	19,01
1279	t-1-3A	3	1	3	1,28	2,30	88,97	7,45
1280	t-1-3A	3	1	3	1,19	2,29	88,69	7,83
1281	t-1-3A	3	1	3	1,46	2,18	88,43	7,93
1282	t-1-3B	3	1	3	17,38	16,93	41,78	23,91
1283	t-1-3B	3	1	3	18,00	16,53	41,55	23,92
1284	t-1-3B	3	1	3	18,54	16,31	40,16	24,98
1285	t-2-3A	3	1	3	0,74	3,03	88,22	8,01
1286	t-2-3A	3	1	3	0,92	2,60	89,19	7,29
1287	t-2-3A	3	1	3	0,63	3,22	88,63	7,53
1288	t-2-3B	3	1	3	18,36	23,50	34,59	23,55
1289	t-2-3B	3	1	3	20,72	20,46	35,68	23,14
1290	t-2-3B	3	1	3	17,49	23,41	34,79	24,31
1291	t-3-3A	3	1	3	1,30	4,32	84,88	9,50
1292	t-3-3A	3	1	3	1,70	4,13	83,56	10,61
1293	t-3-3A	3	1	3	1,39	4,59	83,77	10,25
1294	t-3-3B	3	1	3	26,10	18,34	34,15	21,41
1295	t-3-3B	3	1	3	27,39	16,29	33,51	22,82
1296	t-3-3B	3	1	3	24,45	19,25	33,13	23,17
1297	c-1-1	3	1	4	29,90	27,41	23,63	
1298	c-1-1	3	1	4	29,94	27,21	22,60	
1299	c-1-1	3	1	4	33,33	30,58	27,37	
1300	t-1-1	3	1	4	28,55	29,28	27,14	
1301	t-1-1	3	1	4	28,46	27,84	26,75	
1302	t-1-1	3	1	4	28,01	26,99	25,10	
1303	t-2-1	3	1	4	28,34	26,95	24,36	
1304	t-2-1	3	1	4	29,75	29,85	26,54	
1305	t-2-1	3	1	4	28,35	26,23	25,31	
1306	t-3-1	3	1	4	30,23	29,52	24,94	
1307	t-3-1	3	1	4	26,96	24,57	22,76	
1308	t-3-1	3	1	4	31,06	26,80	24,69	
1309	c-1-2	3	1	4	7,05	252,11	65,45	
1310	c-1-2	3	1	4	8,43	259,20	70,10	
1311	c-1-2	3	1	4	8,32	262,56	73,96	
1312	t-1-2	3	1	4	7,41	261,77	72,64	
1313	t-1-2	3	1	4	7,08	264,42	71,07	
1314	t-1-2	3	1	4	8,17	263,32	72,28	
1315	t-2-2	3	1	4	7,72	264,14	70,79	
1316	t-2-2	3	1	4	6,76	261,16	69,86	
1317	t-2-2	3	1	4	8,24	271,18	73,09	
1318	t-3-2	3	1	4	7,24	260,76	71,21	

1319	t-3-2	3	1	4	6,93	275,62	75,51	
1320	t-3-2	3	1	4	7,62	276,77	75,46	
1321	c-1-3A	3	1	4	1,70	8,67	50,45	39,17
1322	c-1-3A	3	1	4	2,54	7,48	50,80	39,18
1323	c-1-3A	3	1	4	2,12	8,54	51,34	38,00
1324	c-1-3B	3	1	4	30,44	13,76	17,17	38,64
1325	c-1-3B	3	1	4	31,42	14,81	15,81	37,96
1326	c-1-3B	3	1	4	35,05	12,62	17,67	34,67
1327	t-1-3A	3	1	4	0,79	3,75	65,40	30,06
1328	t-1-3A	3	1	4	0,66	3,37	64,86	31,11
1329	t-1-3A	3	1	4	0,65	4,50	65,89	28,95
1330	t-1-3B	3	1	4	17,39	8,55	42,42	31,64
1331	t-1-3B	3	1	4	16,41	8,45	41,82	33,32
1332	t-1-3B	3	1	4	18,00	9,43	41,36	31,21
1333	t-2-3A	3	1	4	0,78	5,84	65,64	27,74
1334	t-2-3A	3	1	4	1,25	5,56	64,58	28,61
1335	t-2-3A	3	1	4	1,11	5,27	66,45	27,17
1336	t-2-3B	3	1	4	23,34	12,03	32,92	31,71
1337	t-2-3B	3	1	4	25,85	9,91	35,47	28,78
1338	t-2-3B	3	1	4	23,48	11,29	35,86	29,37
1339	t-3-3A	3	1	4	2,20	6,90	64,73	26,17
1340	t-3-3A	3	1	4	1,98	6,30	61,69	30,03
1341	t-3-3A	3	1	4	2,33	9,94	54,70	33,03
1342	t-3-3B	3	1	4	31,25	12,84	28,51	27,40
1343	t-3-3B	3	1	4	28,69	12,05	28,06	31,19
1344	t-3-3B	3	1	4	23,01	17,64	23,66	35,69
1345	c-1-1	3	2	5	43,95	37,94	30,04	
1346	c-1-1	3	2	5	42,03	34,49	26,08	
1347	c-1-1	3	2	5	43,59	36,67	29,34	
1348	t-1-1	3	2	5	55,15	53,71	46,11	
1349	t-1-1	3	2	5	53,85	49,74	45,67	
1350	t-1-1	3	2	5	51,97	50,09	44,07	
1351	t-2-1	3	2	5	55,73	51,64	41,21	
1352	t-2-1	3	2	5	53,95	51,35	41,72	
1353	t-2-1	3	2	5	54,32	50,33	38,99	
1354	t-3-1	3	2	5	50,72	45,85	38,33	
1355	t-3-1	3	2	5	51,64	47,77	35,04	
1356	t-3-1	3	2	5	52,55	50,80	43,01	
1357	c-1-2	3	2	5	2,99	279,36	61,05	
1358	c-1-2	3	2	5	3,99	271,20	64,34	
1359	c-1-2	3	2	5	3,53	269,35	65,21	
1360	t-1-2	3	2	5	3,25	258,71	59,62	
1361	t-1-2	3	2	5	3,02	262,02	60,11	
1362	t-1-2	3	2	5	2,72	257,92	58,34	

1363	t-2-2	3	2	5	4,02	264,71	69,82	
1364	t-2-2	3	2	5	3,32	258,94	57,82	
1365	t-2-2	3	2	5	3,08	257,76	59,00	
1366	t-3-2	3	2	5	3,43	266,43	63,33	
1367	t-3-2	3	2	5	3,53	266,02	63,61	
1368	t-3-2	3	2	5	2,99	267,13	61,21	
1369	c-1-3A	3	2	5	4,91	12,41	63,20	19,48
1370	c-1-3A	3	2	5	5,65	12,03	60,46	21,85
1371	c-1-3A	3	2	5	5,83	12,14	63,05	18,97
1372	c-1-3B	3	2	5	40,61	19,78	16,33	23,28
1373	c-1-3B	3	2	5	40,81	21,38	14,10	23,71
1374	c-1-3B	3	2	5	45,65	20,18	14,35	19,81
1375	t-1-3A	3	2	5	1,18	3,67	83,66	11,48
1376	t-1-3A	3	2	5	1,13	3,95	83,20	11,72
1377	t-1-3A	3	2	5	1,89	3,90	82,51	11,70
1378	t-1-3B	3	2	5	27,28	20,46	31,72	20,53
1379	t-1-3B	3	2	5	27,19	18,39	32,84	21,58
1380	t-1-3B	3	2	5	30,75	15,66	36,12	17,47
1381	t-2-3A	3	2	5	2,64	4,05	80,18	13,13
1382	t-2-3A	3	2	5	2,84	4,59	79,50	13,08
1383	t-2-3A	3	2	5	2,70	5,04	79,53	12,72
1384	t-2-3B	3	2	5	32,98	19,59	27,36	20,07
1385	t-2-3B	3	2	5	31,88	18,37	30,46	19,29
1386	t-2-3B	3	2	5	28,69	21,30	27,83	22,19
1387	t-3-3A	3	2	5	4,64	6,72	74,98	13,66
1388	t-3-3A	3	2	5	3,83	6,92	75,23	14,02
1389	t-3-3A	3	2	5	3,65	6,11	75,85	14,40
1390	t-3-3B	3	2	5	37,95	19,21	24,16	18,68
1391	t-3-3B	3	2	5	36,13	18,55	25,03	20,28
1392	t-3-3B	3	2	5	34,27	24,34	21,16	20,23
1393	c-1-1	3	2	6	21,48	16,17	13,04	
1394	c-1-1	3	2	6	22,10	16,56	12,32	
1395	c-1-1	3	2	6	20,07	14,85	12,78	
1396	t-1-1	3	2	6	32,17	28,14	28,74	
1397	t-1-1	3	2	6	30,75	29,20	29,04	
1398	t-1-1	3	2	6	31,42	29,25	30,77	
1399	t-2-1	3	2	6	27,25	23,93	21,83	
1400	t-2-1	3	2	6	28,71	23,12	19,87	
1401	t-2-1	3	2	6	28,59	23,01	21,22	
1402	t-3-1	3	2	6	26,06	19,92	14,02	
1403	t-3-1	3	2	6	24,01	19,05	13,41	
1404	t-3-1	3	2	6	23,82	16,51	13,12	
1405	c-1-2	3	2	6	39,35	325,86	98,01	
1406	c-1-2	3	2	6	43,28	314,52	93,74	

1407	c-1-2	3	2	6	41,37	315,27	95,45	
1408	t-1-2	3	2	6	40,78	302,45	86,69	
1409	t-1-2	3	2	6	41,76	317,67	92,07	
1410	t-1-2	3	2	6	40,81	313,55	88,88	
1411	t-2-2	3	2	6	43,19	312,22	89,62	
1412	t-2-2	3	2	6	42,73	315,14	93,39	
1413	t-2-2	3	2	6	41,90	311,49	91,03	
1414	t-3-2	3	2	6	42,62	316,29	92,84	
1415	t-3-2	3	2	6	42,56	311,24	94,37	
1416	t-3-2	3	2	6	41,22	317,09	96,26	
1417	c-1-3A	3	2	6	1,05	10,13	42,33	46,48
1418	c-1-3A	3	2	6	1,13	12,84	37,93	48,11
1419	c-1-3A	3	2	6	0,86	10,41	33,73	55,00
1420	c-1-3B	3	2	6	22,36	13,86	15,09	48,70
1421	c-1-3B	3	2	6	24,20	13,69	14,73	47,39
1422	c-1-3B	3	2	6	19,70	14,57	12,01	53,72
1423	t-1-3A	3	2	6	0,43	5,47	66,26	27,84
1424	t-1-3A	3	2	6	0,34	5,81	63,25	30,59
1425	t-1-3A	3	2	6	0,39	6,33	65,58	27,70
1426	t-1-3B	3	2	6	14,85	16,41	29,88	38,86
1427	t-1-3B	3	2	6	16,04	16,19	30,97	36,80
1428	t-1-3B	3	2	6	17,18	16,06	31,43	35,33
1429	t-2-3A	3	2	6	0,50	8,70	56,41	34,39
1430	t-2-3A	3	2	6	0,59	8,86	55,68	34,87
1431	t-2-3A	3	2	6	0,68	8,84	54,06	36,41
1432	t-2-3B	3	2	6	15,79	20,48	21,47	42,26
1433	t-2-3B	3	2	6	18,57	19,25	21,04	41,14
1434	t-2-3B	3	2	6	11,69	19,45	22,95	45,91
1435	t-3-3A	3	2	6	0,81	10,75	45,56	42,89
1436	t-3-3A	3	2	6	0,92	16,06	39,42	43,60
1437	t-3-3A	3	2	6	0,68	15,47	38,23	45,62
1438	t-3-3B	3	2	6	19,84	17,99	15,66	46,51
1439	t-3-3B	3	2	6	16,75	22,70	14,49	46,06
1440	t-3-3B	3	2	6	16,07	20,12	15,23	48,57
1441	c-1-1	3	2	7	14,67	8,49	3,28	
1442	c-1-1	3	2	7	13,56	8,09	3,30	
1443	c-1-1	3	2	7	16,30	8,96	3,68	
1444	t-1-1	3	2	7	26,96	16,61	11,88	
1445	t-1-1	3	2	7	28,81	18,33	14,28	
1446	t-1-1	3	2	7	27,51	17,94	14,24	
1447	t-2-1	3	2	7	25,83	13,90	6,82	
1448	t-2-1	3	2	7	26,51	13,97	7,41	
1449	t-2-1	3	2	7	26,97	15,72	8,16	
1450	t-3-1	3	2	7	18,55	11,01	4,20	

1451	t-3-1	3	2	7	19,41	10,51	3,94	
1452	t-3-1	3	2	7	19,66	11,46	3,60	
1453	c-1-2	3	2	7	4,01	280,86	67,93	
1454	c-1-2	3	2	7	3,16	278,46	64,05	
1455	c-1-2	3	2	7	4,93	289,21	69,69	
1456	t-1-2	3	2	7	3,50	284,48	64,18	
1457	t-1-2	3	2	7	3,74	289,32	67,41	
1458	t-1-2	3	2	7	3,35	292,09	70,97	
1459	t-2-2	3	2	7	3,90	292,40	69,48	
1460	t-2-2	3	2	7	3,40	249,34	59,06	
1461	t-2-2	3	2	7	4,16	293,65	70,31	
1462	t-3-2	3	2	7	3,37	280,48	66,56	
1463	t-3-2	3	2	7	3,36	292,41	67,71	
1464	t-3-2	3	2	7	3,86	283,72	69,66	
1465	c-1-3A	3	2	7	0,16	21,69	14,80	63,36
1466	c-1-3A	3	2	7	0,12	22,03	13,54	64,31
1467	c-1-3A	3	2	7	0,22	18,78	18,01	62,99
1468	c-1-3B	3	2	7	7,51	24,79	3,20	64,50
1469	c-1-3B	3	2	7	5,11	27,65	2,67	64,56
1470	c-1-3B	3	2	7	10,00	24,07	3,18	62,75
1471	t-1-3A	3	2	7	0,54	16,20	43,75	39,50
1472	t-1-3A	3	2	7	0,58	20,42	46,22	32,78
1473	t-1-3A	3	2	7	0,46	14,47	49,25	35,82
1474	t-1-3B	3	2	7	4,72	31,29	20,06	43,92
1475	t-1-3B	3	2	7	7,37	35,04	23,21	34,38
1476	t-1-3B	3	2	7	7,37	31,08	20,81	40,75
1477	t-2-3A	3	2	7	0,18	31,43	30,48	37,92
1478	t-2-3A	3	2	7	0,37	28,05	33,36	38,22
1479	t-2-3A	3	2	7	0,52	28,43	31,03	40,02
1480	t-2-3B	3	2	7	3,85	44,88	9,83	41,44
1481	t-2-3B	3	2	7	4,16	42,19	10,97	42,69
1482	t-2-3B	3	2	7	5,86	39,97	10,67	43,50
1483	t-3-3A	3	2	7	0,49	28,93	16,96	53,62
1484	t-3-3A	3	2	7	0,19	24,26	19,96	55,58
1485	t-3-3A	3	2	7	0,31	30,91	20,27	48,50
1486	t-3-3B	3	2	7	3,61	36,42	4,70	55,28
1487	t-3-3B	3	2	7	4,38	32,58	5,80	57,25
1488	t-3-3B	3	2	7	5,00	39,12	5,10	50,77
1489	c-1-1	3	2	8	17,31	18,08	16,25	
1490	c-1-1	3	2	8	19,80	20,45	18,76	
1491	c-1-1	3	2	8	20,85	20,77	17,65	
1492	t-1-1	3	2	8	24,26	24,89	22,71	
1493	t-1-1	3	2	8	24,36	25,81	23,12	
1494	t-1-1	3	2	8	25,02	24,01	19,97	

1495	t-2-1	3	2	8	22,36	21,45	16,24	
1496	t-2-1	3	2	8	21,78	22,09	19,15	
1497	t-2-1	3	2	8	20,91	20,95	16,86	
1498	t-3-1	3	2	8	21,20	19,53	15,28	
1499	t-3-1	3	2	8	20,31	20,67	17,15	
1500	t-3-1	3	2	8	20,33	21,30	17,54	
1501	c-1-2	3	2	8	4,96	278,66	72,28	
1502	c-1-2	3	2	8	5,49	290,67	72,90	
1503	c-1-2	3	2	8	5,29	285,80	63,59	
1504	t-1-2	3	2	8	5,15	286,48	71,72	
1505	t-1-2	3	2	8	5,30	293,44	73,47	
1506	t-1-2	3	2	8	5,18	294,20	74,11	
1507	t-2-2	3	2	8	5,18	295,04	72,32	
1508	t-2-2	3	2	8	5,21	294,86	71,79	
1509	t-2-2	3	2	8	5,01	295,64	75,61	
1510	t-3-2	3	2	8	4,79	310,60	74,64	
1511	t-3-2	3	2	8	5,39	298,88	72,73	
1512	t-3-2	3	2	8	5,57	292,33	73,64	
1513	c-1-3A	3	2	8	3,30	14,30	47,60	34,80
1514	c-1-3A	3	2	8	2,94	10,21	52,66	34,19
1515	c-1-3A	3	2	8	2,27	33,08	36,79	27,86
1516	c-1-3B	3	2	8	33,28	21,60	7,24	37,88
1517	c-1-3B	3	2	8	42,50	15,09	8,59	33,82
1518	c-1-3B	3	2	8	28,69	37,29	6,84	27,17
1519	t-1-3A	3	2	8	0,36	9,66	62,43	27,54
1520	t-1-3A	3	2	8	0,61	9,49	60,93	28,97
1521	t-1-3A	3	2	8	0,38	12,69	63,17	23,76
1522	t-1-3B	3	2	8	28,22	16,32	24,41	31,06
1523	t-1-3B	3	2	8	24,13	16,81	26,17	32,89
1524	t-1-3B	3	2	8	24,38	23,13	21,76	30,73
1525	t-2-3A	3	2	8	1,26	24,66	41,76	32,31
1526	t-2-3A	3	2	8	0,65	12,28	49,63	37,44
1527	t-2-3A	3	2	8	0,85	15,84	45,15	38,17
1528	t-2-3B	3	2	8	17,01	32,00	11,80	39,19
1529	t-2-3B	3	2	8	19,77	21,71	15,19	43,33
1530	t-2-3B	3	2	8	20,47	22,37	14,08	43,08
1531	t-3-3A	3	2	8	1,16	15,01	43,05	40,78
1532	t-3-3A	3	2	8	1,07	17,08	40,70	41,14
1533	t-3-3A	3	2	8	0,97	16,81	39,66	42,56
1534	t-3-3B	3	2	8	22,13	21,84	10,27	45,76
1535	t-3-3B	3	2	8	19,33	22,37	9,06	49,23
1536	t-3-3B	3	2	8	18,68	24,70	8,77	47,85
1537	c-1-1	3	3	9	39,56	37,76	33,05	
1538	c-1-1	3	3	9	39,19	36,11	29,98	

1539	c-1-1	3	3	9	40,28	38,13	34,46	
1540	t-1-1	3	3	9	37,66	36,41	35,19	
1541	t-1-1	3	3	9	36,76	35,14	35,42	
1542	t-1-1	3	3	9	36,69	36,43	34,59	
1543	t-2-1	3	3	9	36,07	34,43	29,79	
1544	t-2-1	3	3	9	37,08	34,78	30,76	
1545	t-2-1	3	3	9	34,85	34,61	30,04	
1546	t-3-1	3	3	9	32,14	31,30	25,56	
1547	t-3-1	3	3	9	33,39	32,22	27,92	
1548	t-3-1	3	3	9	32,58	31,51	27,53	
1549	c-1-2	3	3	9	4,73	246,92	53,79	
1550	c-1-2	3	3	9	4,86	246,84	53,64	
1551	c-1-2	3	3	9	4,83	243,44	53,16	
1552	t-1-2	3	3	9	4,81	247,15	53,99	
1553	t-1-2	3	3	9	5,36	250,01	54,97	
1554	t-1-2	3	3	9	5,47	252,34	57,40	
1555	t-2-2	3	3	9	5,13	261,18	55,66	
1556	t-2-2	3	3	9	4,21	252,94	54,03	
1557	t-2-2	3	3	9	4,82	266,44	55,75	
1558	t-3-2	3	3	9	4,92	263,73	56,72	
1559	t-3-2	3	3	9	4,60	254,80	56,37	
1560	t-3-2	3	3	9	5,33	258,64	60,57	
1561	c-1-3A	3	3	9	0,94	5,87	56,66	36,52
1562	c-1-3A	3	3	9	1,30	6,56	55,19	36,95
1563	c-1-3A	3	3	9	0,98	6,78	51,19	41,05
1564	c-1-3B	3	3	9	26,56	19,63	12,91	40,91
1565	c-1-3B	3	3	9	21,38	20,06	15,02	43,54
1566	c-1-3B	3	3	9	17,14	21,20	14,68	46,98
1567	t-1-3A	3	3	9	0,63	5,42	66,55	27,39
1568	t-1-3A	3	3	9	0,61	3,75	69,37	26,26
1569	t-1-3A	3	3	9	0,77	5,68	63,95	29,60
1570	t-1-3B	3	3	9	15,82	17,14	31,88	35,16
1571	t-1-3B	3	3	9	14,87	14,39	34,22	36,52
1572	t-1-3B	3	3	9	10,54	16,21	32,26	40,99
1573	t-2-3A	3	3	9	1,00	5,31	60,04	33,65
1574	t-2-3A	3	3	9	0,69	4,81	65,51	28,99
1575	t-2-3A	3	3	9	0,94	5,18	63,32	30,56
1576	t-2-3B	3	3	9	14,61	19,63	22,12	43,64
1577	t-2-3B	3	3	9	15,02	19,28	24,70	41,00
1578	t-2-3B	3	3	9	13,54	19,54	23,11	43,82
1579	t-3-3A	3	3	9	1,02	6,93	53,81	38,24
1580	t-3-3A	3	3	9	0,97	7,24	61,24	30,55
1581	t-3-3A	3	3	9	1,34	7,56	56,01	35,08
1582	t-3-3B	3	3	9	14,29	21,56	16,76	47,38

1583	t-3-3B	3	3	9	10,54	27,00	21,57	40,88
1584	t-3-3B	3	3	9	14,13	22,84	17,80	45,23
1585	c-1-1	3	3	10	19,00	17,85	15,13	
1586	c-1-1	3	3	10	19,20	15,77	12,63	
1587	c-1-1	3	3	10	19,60	17,54	14,69	
1588	t-1-1	3	3	10	29,30	28,68	25,73	
1589	t-1-1	3	3	10	31,96	30,10	26,54	
1590	t-1-1	3	3	10	30,24	29,15	26,87	
1591	t-2-1	3	3	10	25,10	23,14	17,62	
1592	t-2-1	3	3	10	29,87	26,83	17,81	
1593	t-2-1	3	3	10	26,60	24,48	22,16	
1594	t-3-1	3	3	10	20,73	17,99	19,32	
1595	t-3-1	3	3	10	20,57	16,95	12,95	
1596	t-3-1	3	3	10	21,49	16,05	12,42	
1597	c-1-2	3	3	10	7,67	282,98	74,47	
1598	c-1-2	3	3	10	7,85	281,20	69,02	
1599	c-1-2	3	3	10	7,85	286,84	71,76	
1600	t-1-2	3	3	10	6,80	302,35	74,80	
1601	t-1-2	3	3	10	7,83	295,58	72,89	
1602	t-1-2	3	3	10	7,26	291,66	74,18	
1603	t-2-2	3	3	10	6,92	296,88	74,11	
1604	t-2-2	3	3	10	7,68	298,23	75,46	
1605	t-2-2	3	3	10	6,63	295,77	69,74	
1606	t-3-2	3	3	10	7,00	291,30	74,33	
1607	t-3-2	3	3	10	6,69	291,53	71,60	
1608	t-3-2	3	3	10	7,40	302,77	77,81	
1609	c-1-3A	3	3	10	0,74	4,44	47,33	47,49
1610	c-1-3A	3	3	10	0,65	4,74	45,89	48,72
1611	c-1-3A	3	3	10	0,78	5,22	44,72	49,28
1612	c-1-3B	3	3	10	30,92	11,44	11,51	46,14
1613	c-1-3B	3	3	10	30,21	12,10	10,21	47,48
1614	c-1-3B	3	3	10	32,63	12,19	10,79	44,39
1615	t-1-3A	3	3	10	0,46	3,81	65,21	30,52
1616	t-1-3A	3	3	10	0,82	3,89	66,70	28,59
1617	t-1-3A	3	3	10	0,80	3,72	67,22	28,26
1618	t-1-3B	3	3	10	21,11	17,51	27,99	33,40
1619	t-1-3B	3	3	10	19,13	15,85	29,72	35,30
1620	t-1-3B	3	3	10	21,82	16,77	28,56	32,86
1621	t-2-3A	3	3	10	0,58	5,17	57,74	36,52
1622	t-2-3A	3	3	10	0,54	4,80	60,65	34,01
1623	t-2-3A	3	3	10	0,81	4,39	63,91	30,89
1624	t-2-3B	3	3	10	21,58	18,85	20,09	39,48
1625	t-2-3B	3	3	10	25,53	16,42	20,13	37,92
1626	t-2-3B	3	3	10	26,79	16,92	22,39	33,91

1627	t-3-3A	3	3	10	0,60	5,55	54,82	39,03
1628	t-3-3A	3	3	10	0,95	5,92	51,01	42,12
1629	t-3-3A	3	3	10	0,91	6,34	52,05	40,70
1630	t-3-3B	3	3	10	27,14	16,39	16,39	40,07
1631	t-3-3B	3	3	10	22,52	17,29	13,62	46,56
1632	t-3-3B	3	3	10	24,57	17,32	14,55	43,56
1633	c-1-1	3	3	11	25,70	26,39	26,02	
1634	c-1-1	3	3	11	26,13	25,62	22,32	
1635	c-1-1	3	3	11	25,30	24,57	21,96	
1636	t-1-1	3	3	11	34,16	34,16	27,06	
1637	t-1-1	3	3	11	33,89	33,45	29,95	
1638	t-1-1	3	3	11	34,44	36,69	32,96	
1639	t-2-1	3	3	11	34,14	34,59	30,89	
1640	t-2-1	3	3	11	35,06	35,05	32,69	
1641	t-2-1	3	3	11	35,83	35,86	30,43	
1642	t-3-1	3	3	11	30,82	31,59	22,38	
1643	t-3-1	3	3	11	29,69	30,75	23,92	
1644	t-3-1	3	3	11	30,16	28,63	22,45	
1645	c-1-2	3	3	11	4,82	237,72	56,43	
1646	c-1-2	3	3	11	4,84	243,29	52,89	
1647	c-1-2	3	3	11	4,88	236,99	55,86	
1648	t-1-2	3	3	11	5,11	238,99	56,15	
1649	t-1-2	3	3	11	5,12	251,41	64,78	
1650	t-1-2	3	3	11	5,72	242,37	66,58	
1651	t-2-2	3	3	11	5,07	240,88	60,44	
1652	t-2-2	3	3	11	4,73	242,29	60,54	
1653	t-2-2	3	3	11	4,89	245,48	60,65	
1654	t-3-2	3	3	11	6,74	247,01	65,23	
1655	t-3-2	3	3	11	4,81	242,63	59,78	
1656	t-3-2	3	3	11	4,44	242,65	58,96	
1657	c-1-3A	3	3	11	1,32	6,69	53,43	38,56
1658	c-1-3A	3	3	11	1,45	6,84	52,68	39,02
1659	c-1-3A	3	3	11	1,92	8,54	49,04	40,50
1660	c-1-3B	3	3	11	21,41	13,93	19,54	45,11
1661	c-1-3B	3	3	11	25,98	13,31	18,68	42,03
1662	c-1-3B	3	3	11	26,95	13,92	17,13	41,99
1663	t-1-3A	3	3	11	0,72	3,99	64,96	30,33
1664	t-1-3A	3	3	11	0,59	5,10	57,00	37,32
1665	t-1-3A	3	3	11	0,73	4,30	64,66	30,31
1666	t-1-3B	3	3	11	13,27	13,35	28,00	45,38
1667	t-1-3B	3	3	11	11,53	13,49	24,95	50,03
1668	t-1-3B	3	3	11	19,21	13,82	26,60	40,37
1669	t-2-3A	3	3	11	0,64	4,44	67,84	27,08
1670	t-2-3A	3	3	11	0,57	4,77	65,93	28,74

1671	t-2-3A	3	3	11	0,60	3,57	66,30	29,53
1672	t-2-3B	3	3	11	16,79	13,40	28,61	41,19
1673	t-2-3B	3	3	11	21,17	14,33	28,01	36,49
1674	t-2-3B	3	3	11	14,18	14,23	28,38	43,21
1675	t-3-3A	3	3	11	0,70	6,38	53,86	39,07
1676	t-3-3A	3	3	11	0,93	5,22	53,94	39,91
1677	t-3-3A	3	3	11	0,70	5,93	57,03	36,34
1678	t-3-3B	3	3	11	20,58	15,68	20,65	43,09
1679	t-3-3B	3	3	11	18,32	14,48	20,96	46,24
1680	t-3-3B	3	3	11	20,82	15,43	22,59	41,17
1681	c-1-1	3	3	12	26,21	28,31	23,44	
1682	c-1-1	3	3	12	28,36	27,86	22,92	
1683	c-1-1	3	3	12	26,23	24,90	20,37	
1684	t-1-1	3	3	12	30,77	35,39	30,27	
1685	t-1-1	3	3	12	31,53	35,97	31,57	
1686	t-1-1	3	3	12	32,55	35,28	32,98	
1687	t-2-1	3	3	12	30,81	35,28	25,63	
1688	t-2-1	3	3	12	31,47	35,26	28,38	
1689	t-2-1	3	3	12	29,34	33,95	27,32	
1690	t-3-1	3	3	12	29,32	32,48	26,36	
1691	t-3-1	3	3	12	28,83	30,54	26,75	
1692	t-3-1	3	3	12	28,17	34,20	27,77	
1693	c-1-2	3	3	12	4,12	219,88	53,90	
1694	c-1-2	3	3	12	4,34	222,03	57,28	
1695	c-1-2	3	3	12	4,27	231,96	57,25	
1696	t-1-2	3	3	12	3,93	240,74	54,17	
1697	t-1-2	3	3	12	4,64	243,02	57,77	
1698	t-1-2	3	3	12	4,39	250,40	55,39	
1699	t-2-2	3	3	12	3,95	251,57	53,78	
1700	t-2-2	3	3	12	3,72	256,45	55,73	
1701	t-2-2	3	3	12	3,92	263,08	58,96	
1702	t-3-2	3	3	12	4,02	259,27	59,43	
1703	t-3-2	3	3	12	3,24	255,40	53,98	
1704	t-3-2	3	3	12	3,42	259,32	57,01	
1705	c-1-3A	3	3	12	1,90	4,71	76,03	17,37
1706	c-1-3A	3	3	12	2,02	6,08	75,29	16,61
1707	c-1-3A	3	3	12	2,46	6,44	72,57	18,53
1708	c-1-3B	3	3	12	40,06	9,04	27,43	23,47
1709	c-1-3B	3	3	12	39,15	10,26	28,15	22,45
1710	c-1-3B	3	3	12	41,07	11,70	24,35	22,87
1711	t-1-3A	3	3	12	1,49	2,28	84,55	11,69
1712	t-1-3A	3	3	12	1,63	2,51	83,50	12,36
1713	t-1-3A	3	3	12	1,80	2,55	84,66	11,00
1714	t-1-3B	3	3	12	24,35	9,04	46,41	20,19

1715	t-1-3B	3	3	12	22,56	8,01	49,67	19,77
1716	t-1-3B	3	3	12	27,77	8,34	45,16	18,73
1717	t-2-3A	3	3	12	0,92	3,34	80,98	14,77
1718	t-2-3A	3	3	12	1,45	3,65	79,75	15,15
1719	t-2-3A	3	3	12	1,30	2,68	82,28	13,75
1720	t-2-3B	3	3	12	25,90	10,98	39,90	23,22
1721	t-2-3B	3	3	12	28,06	10,36	37,59	23,99
1722	t-2-3B	3	3	12	29,78	10,26	38,29	21,66
1723	t-3-3A	3	3	12	1,70	4,49	76,17	17,64
1724	t-3-3A	3	3	12	1,42	5,31	74,38	18,89
1725	t-3-3A	3	3	12	1,36	4,86	74,63	19,15
1726	t-3-3B	3	3	12	31,12	12,83	31,01	25,04
1727	t-3-3B	3	3	12	33,64	13,06	28,62	24,67
1728	t-3-3B	3	3	12	28,07	11,99	34,56	25,38
1729	c-1-1	4	1	1	39,89	33,25	27,15	
1730	c-1-1	4	1	1	40,15	35,86	28,52	
1731	c-1-1	4	1	1	37,45	28,30	23,46	
1732	t-1-1	4	1	1	32,74	32,19	30,68	
1733	t-1-1	4	1	1	37,05	36,41	34,80	
1734	t-1-1	4	1	1	33,77	32,95	28,92	
1735	t-2-1	4	1	1	42,45	36,90	29,83	
1736	t-2-1	4	1	1	40,59	37,60	31,48	
1737	t-2-1	4	1	1	40,88	35,02	30,15	
1738	t-3-1	4	1	1	44,25	39,44	31,95	
1739	t-3-1	4	1	1	42,07	36,02	26,95	
1740	t-3-1	4	1	1	44,78	37,43	36,67	
1741	c-1-2	4	1	1	1,48	194,54	41,79	
1742	c-1-2	4	1	1	3,16	227,20	52,32	
1743	c-1-2	4	1	1	2,47	230,81	49,62	
1744	t-1-2	4	1	1	2,06	236,89	48,36	
1745	t-1-2	4	1	1	2,74	235,92	51,11	
1746	t-1-2	4	1	1	2,77	235,15	53,14	
1747	t-2-2	4	1	1	2,82	242,64	51,70	
1748	t-2-2	4	1	1	2,50	236,88	50,18	
1749	t-2-2	4	1	1	2,51	238,53	52,06	
1750	t-3-2	4	1	1	3,05	238,82	53,91	
1751	t-3-2	4	1	1	2,44	240,31	50,39	
1752	t-3-2	4	1	1	2,25	230,37	45,33	
1753	c-1-3A	4	1	1	2,50	6,33	73,88	17,29
1754	c-1-3A	4	1	1	3,18	6,00	75,34	15,47
1755	c-1-3A	4	1	1	3,04	6,79	73,15	17,02
1756	c-1-3B	4	1	1	47,86	12,40	19,76	19,99
1757	c-1-3B	4	1	1	44,01	14,21	20,89	20,89
1758	c-1-3B	4	1	1	49,79	12,27	18,49	19,45

1759	t-1-3A	4	1	1	0,70	2,97	86,21	10,12
1760	t-1-3A	4	1	1	0,64	2,83	87,17	9,36
1761	t-1-3A	4	1	1	0,61	3,28	85,94	10,17
1762	t-1-3B	4	1	1	22,66	13,89	40,02	23,43
1763	t-1-3B	4	1	1	22,81	9,92	43,80	23,46
1764	t-1-3B	4	1	1	22,08	12,59	42,10	23,22
1765	t-2-3A	4	1	1	1,04	4,01	85,47	9,48
1766	t-2-3A	4	1	1	1,34	5,70	83,43	9,53
1767	t-2-3A	4	1	1	1,02	4,28	84,64	10,05
1768	t-2-3B	4	1	1	21,59	15,97	31,78	30,66
1769	t-2-3B	4	1	1	26,26	17,98	29,94	25,81
1770	t-2-3B	4	1	1	11,09	16,09	34,40	38,42
1771	t-3-3A	4	1	1	1,82	5,67	79,43	13,08
1772	t-3-3A	4	1	1	2,09	6,79	78,95	12,17
1773	t-3-3A	4	1	1	2,07	5,26	79,94	12,72
1774	t-3-3B	4	1	1	32,65	15,33	26,82	25,21
1775	t-3-3B	4	1	1	30,89	18,15	25,93	25,03
1776	t-3-3B	4	1	1	38,22	14,91	22,56	24,31
1777	c-1-1	4	1	2	18,92	16,00	17,37	
1778	c-1-1	4	1	2	21,54	17,56	13,94	
1779	c-1-1	4	1	2	18,46	15,09	14,85	
1780	t-1-1	4	1	2	26,06	22,09	26,31	
1781	t-1-1	4	1	2	22,78	22,15	22,68	
1782	t-1-1	4	1	2	23,88	24,53	23,49	
1783	t-2-1	4	1	2	25,62	22,98	20,04	
1784	t-2-1	4	1	2	25,89	22,75	20,58	
1785	t-2-1	4	1	2	24,41	24,24	23,66	
1786	t-3-1	4	1	2	23,11	20,62	19,62	
1787	t-3-1	4	1	2	21,80	20,46	17,82	
1788	t-3-1	4	1	2	22,94	21,43	21,85	
1789	c-1-2	4	1	2	5,66	288,17	66,57	
1790	c-1-2	4	1	2	6,01	269,97	65,54	
1791	c-1-2	4	1	2	5,40	274,81	65,92	
1792	t-1-2	4	1	2	6,60	286,15	73,63	
1793	t-1-2	4	1	2	5,54	276,57	70,26	
1794	t-1-2	4	1	2	6,03	276,83	69,99	
1795	t-2-2	4	1	2	4,28	276,41	70,47	
1796	t-2-2	4	1	2	7,81	297,95	76,79	
1797	t-2-2	4	1	2	5,78	274,76	71,48	
1798	t-3-2	4	1	2	5,57	276,54	71,91	
1799	t-3-2	4	1	2	5,87	269,37	70,08	
1800	t-3-2	4	1	2	5,30	270,33	67,73	
1801	c-1-3A	4	1	2	2,32	5,79	74,40	17,49
1802	c-1-3A	4	1	2	2,47	4,84	74,09	18,60

1803	c-1-3A	4	1	2	2,54	8,46	70,18	18,82
1804	c-1-3B	4	1	2	31,93	12,08	32,26	23,73
1805	c-1-3B	4	1	2	28,59	9,29	38,18	23,93
1806	c-1-3B	4	1	2	30,09	11,17	34,59	24,15
1807	t-1-3A	4	1	2	1,25	3,71	78,05	16,99
1808	t-1-3A	4	1	2	0,58	4,19	79,40	15,83
1809	t-1-3A	4	1	2	0,95	5,00	77,85	16,19
1810	t-1-3B	4	1	2	21,94	10,07	45,58	22,42
1811	t-1-3B	4	1	2	22,24	12,23	41,34	24,19
1812	t-1-3B	4	1	2	19,72	12,13	43,22	24,93
1813	t-2-3A	4	1	2	1,04	4,51	77,57	16,87
1814	t-2-3A	4	1	2	1,44	5,22	77,10	16,24
1815	t-2-3A	4	1	2	1,72	5,36	76,12	16,79
1816	t-2-3B	4	1	2	18,31	12,73	43,10	25,85
1817	t-2-3B	4	1	2	23,64	12,54	41,10	22,72
1818	t-2-3B	4	1	2	22,24	11,03	41,16	25,57
1819	t-3-3A	4	1	2	1,65	10,10	68,45	19,80
1820	t-3-3A	4	1	2	1,57	5,87	73,85	18,71
1821	t-3-3A	4	1	2	1,48	6,76	70,87	20,89
1822	t-3-3B	4	1	2	22,81	17,52	32,82	26,84
1823	t-3-3B	4	1	2	18,69	13,09	39,56	28,67
1824	t-3-3B	4	1	2	24,25	12,92	35,99	26,83
1825	c-1-1	4	1	3	34,79	26,70	21,10	
1826	c-1-1	4	1	3	30,37	26,35	23,70	
1827	c-1-1	4	1	3	34,85	30,17	26,08	
1828	t-1-1	4	1	3	41,55	36,57	32,35	
1829	t-1-1	4	1	3	39,42	35,37	30,55	
1830	t-1-1	4	1	3	41,42	35,78	29,66	
1831	t-2-1	4	1	3	43,69	35,26	27,39	
1832	t-2-1	4	1	3	47,64	38,23	32,63	
1833	t-2-1	4	1	3	42,29	38,39	31,90	
1834	t-3-1	4	1	3	38,57	32,15	27,73	
1835	t-3-1	4	1	3	40,28	32,51	24,07	
1836	t-3-1	4	1	3	41,59	35,54	27,89	
1837	c-1-2	4	1	3	4,07	256,22	55,37	
1838	c-1-2	4	1	3	3,76	246,86	58,27	
1839	c-1-2	4	1	3	4,45	246,15	54,57	
1840	t-1-2	4	1	3	3,28	246,19	54,39	
1841	t-1-2	4	1	3	3,89	249,06	53,64	
1842	t-1-2	4	1	3	2,85	252,41	52,28	
1843	t-2-2	4	1	3	3,23	216,88	47,37	
1844	t-2-2	4	1	3	4,18	247,09	54,51	
1845	t-2-2	4	1	3	3,32	256,27	55,35	
1846	t-3-2	4	1	3	3,30	254,51	52,90	

1847	t-3-2	4	1	3	3,56	256,22	54,02	
1848	t-3-2	4	1	3	3,64	268,05	58,78	
1849	c-1-3A	4	1	3	2,11	4,89	74,76	18,24
1850	c-1-3A	4	1	3	2,95	5,41	74,56	17,08
1851	c-1-3A	4	1	3	3,93	5,99	73,14	16,94
1852	c-1-3B	4	1	3	41,45	13,74	23,90	20,90
1853	c-1-3B	4	1	3	42,04	13,78	23,18	21,00
1854	c-1-3B	4	1	3	37,01	13,15	26,74	23,09
1855	t-1-3A	4	1	3	1,55	2,60	85,83	10,02
1856	t-1-3A	4	1	3	0,97	2,84	86,45	9,74
1857	t-1-3A	4	1	3	1,05	3,01	85,15	10,80
1858	t-1-3B	4	1	3	21,10	14,82	39,06	25,02
1859	t-1-3B	4	1	3	16,07	19,39	35,76	28,78
1860	t-1-3B	4	1	3	18,81	17,56	34,97	28,66
1861	t-2-3A	4	1	3	1,14	3,69	85,39	9,78
1862	t-2-3A	4	1	3	1,56	4,24	82,49	11,71
1863	t-2-3A	4	1	3	1,47	3,84	83,80	10,89
1864	t-2-3B	4	1	3	21,40	22,04	30,56	25,99
1865	t-2-3B	4	1	3	16,59	21,81	29,72	31,88
1866	t-2-3B	4	1	3	23,22	18,79	30,59	27,40
1867	t-3-3A	4	1	3	2,05	5,65	77,80	14,49
1868	t-3-3A	4	1	3	2,17	5,55	78,79	13,50
1869	t-3-3A	4	1	3	2,40	5,63	79,12	12,86
1870	t-3-3B	4	1	3	25,12	19,74	26,65	28,49
1871	t-3-3B	4	1	3	20,80	23,02	24,40	31,78
1872	t-3-3B	4	1	3	21,58	22,45	26,90	29,07
1873	c-1-1	4	1	4	33,77	31,85	24,95	
1874	c-1-1	4	1	4	30,18	30,88	25,33	
1875	c-1-1	4	1	4	34,29	34,10	29,05	
1876	t-1-1	4	1	4	30,64	32,86	28,82	
1877	t-1-1	4	1	4	28,73	29,52	27,24	
1878	t-1-1	4	1	4	27,16	30,09	26,15	
1879	t-2-1	4	1	4	27,21	28,58	25,28	
1880	t-2-1	4	1	4	28,02	29,50	27,00	
1881	t-2-1	4	1	4	32,21	30,94	28,11	
1882	t-3-1	4	1	4	33,15	34,46	26,01	
1883	t-3-1	4	1	4	33,68	32,35	25,76	
1884	t-3-1	4	1	4	30,17	30,41	26,59	
1885	c-1-2	4	1	4	8,74	267,42	76,84	
1886	c-1-2	4	1	4	7,50	248,15	73,73	
1887	c-1-2	4	1	4	6,77	270,94	76,62	
1888	t-1-2	4	1	4	7,33	253,02	71,56	
1889	t-1-2	4	1	4	7,63	248,04	75,28	
1890	t-1-2	4	1	4	7,08	250,81	71,21	

1891	t-2-2	4	1	4	6,48	240,28	67,24	
1892	t-2-2	4	1	4	6,15	243,91	69,02	
1893	t-2-2	4	1	4	6,45	245,04	68,47	
1894	t-3-2	4	1	4	6,88	248,56	74,27	
1895	t-3-2	4	1	4	6,80	248,73	75,43	
1896	t-3-2	4	1	4	7,49	247,51	76,52	
1897	c-1-3A	4	1	4	4,33	5,65	60,03	30,00
1898	c-1-3A	4	1	4	4,70	7,57	57,55	30,18
1899	c-1-3A	4	1	4	5,09	7,42	61,21	26,29
1900	c-1-3B	4	1	4	39,90	11,71	18,21	30,18
1901	c-1-3B	4	1	4	45,34	10,65	14,78	29,23
1902	c-1-3B	4	1	4	47,30	11,32	15,88	25,49
1903	t-1-3A	4	1	4	1,31	3,99	74,26	20,43
1904	t-1-3A	4	1	4	0,80	3,36	75,28	20,55
1905	t-1-3A	4	1	4	1,46	4,03	70,66	23,85
1906	t-1-3B	4	1	4	24,84	8,46	41,90	24,79
1907	t-1-3B	4	1	4	30,66	8,88	35,33	25,12
1908	t-1-3B	4	1	4	23,89	9,52	37,44	29,16
1909	t-2-3A	4	1	4	3,05	4,11	70,22	22,62
1910	t-2-3A	4	1	4	3,73	3,84	72,10	20,33
1911	t-2-3A	4	1	4	2,98	4,00	79,86	13,17
1912	t-2-3B	4	1	4	32,90	9,59	32,00	25,51
1913	t-2-3B	4	1	4	31,55	11,45	32,16	24,84
1914	t-2-3B	4	1	4	39,63	11,09	30,78	18,50
1915	t-3-3A	4	1	4	4,11	6,40	64,00	25,50
1916	t-3-3A	4	1	4	3,48	7,77	61,25	27,51
1917	t-3-3A	4	1	4	4,30	8,76	64,90	22,04
1918	t-3-3B	4	1	4	28,60	15,26	23,88	32,26
1919	t-3-3B	4	1	4	37,96	13,80	20,72	27,52
1920	t-3-3B	4	1	4	35,78	15,02	25,37	23,84
1921	c-1-1	4	2	5	47,96	39,60	31,22	
1922	c-1-1	4	2	5	49,18	40,63	33,92	
1923	c-1-1	4	2	5	45,26	39,53	32,13	
1924	t-1-1	4	2	5	57,15	55,03	51,41	
1925	t-1-1	4	2	5	58,26	56,05	53,08	
1926	t-1-1	4	2	5	50,11	48,93	44,71	
1927	t-2-1	4	2	5	55,66	47,27	38,13	
1928	t-2-1	4	2	5	55,79	48,35	42,01	
1929	t-2-1	4	2	5	55,50	49,53	42,59	
1930	t-3-1	4	2	5	52,03	45,50	38,74	
1931	t-3-1	4	2	5	49,55	43,57	30,24	
1932	t-3-1	4	2	5	49,38	42,48	33,03	
1933	c-1-2	4	2	5	6,31	273,74	53,44	
1934	c-1-2	4	2	5	6,58	273,53	61,35	

1935	c-1-2	4	2	5	6,27	270,23	58,90	
1936	t-1-2	4	2	5	7,46	266,96	60,56	
1937	t-1-2	4	2	5	6,62	267,04	56,52	
1938	t-1-2	4	2	5	3,39	266,78	57,91	
1939	t-2-2	4	2	5	7,09	267,97	60,08	
1940	t-2-2	4	2	5	8,35	263,40	55,78	
1941	t-2-2	4	2	5	9,14	270,07	62,97	
1942	t-3-2	4	2	5	2,48	266,51	59,35	
1943	t-3-2	4	2	5	6,79	269,63	60,70	
1944	t-3-2	4	2	5	2,78	266,01	57,03	
1945	c-1-3A	4	2	5	5,43	12,45	59,03	23,09
1946	c-1-3A	4	2	5	6,83	12,10	63,53	17,54
1947	c-1-3A	4	2	5	5,65	12,74	61,41	20,19
1948	c-1-3B	4	2	5	45,86	19,38	12,31	22,44
1949	c-1-3B	4	2	5	48,88	18,89	13,18	19,05
1950	c-1-3B	4	2	5	45,11	19,91	13,66	21,31
1951	t-1-3A	4	2	5	1,07	3,44	85,10	10,40
1952	t-1-3A	4	2	5	1,44	2,62	86,58	9,36
1953	t-1-3A	4	2	5	1,19	2,83	86,66	9,32
1954	t-1-3B	4	2	5	33,36	18,68	26,57	21,39
1955	t-1-3B	4	2	5	36,33	20,31	23,57	19,79
1956	t-1-3B	4	2	5	34,29	18,44	26,19	21,08
1957	t-2-3A	4	2	5	2,71	6,53	77,92	12,84
1958	t-2-3A	4	2	5	2,84	6,11	78,10	12,95
1959	t-2-3A	4	2	5	2,47	6,39	78,92	12,22
1960	t-2-3B	4	2	5	25,01	25,98	21,97	27,04
1961	t-2-3B	4	2	5	29,06	24,02	20,29	26,63
1962	t-2-3B	4	2	5	31,97	25,79	19,13	23,11
1963	t-3-3A	4	2	5	3,88	9,85	71,58	14,69
1964	t-3-3A	4	2	5	3,78	10,71	70,52	15,00
1965	t-3-3A	4	2	5	2,96	9,70	73,90	13,44
1966	t-3-3B	4	2	5	33,35	25,73	16,56	24,37
1967	t-3-3B	4	2	5	30,63	26,73	17,01	25,63
1968	t-3-3B	4	2	5	32,97	27,31	16,08	23,65
1969	c-1-1	4	2	6	21,11	12,93	7,94	
1970	c-1-1	4	2	6	23,26	15,10	10,11	
1971	c-1-1	4	2	6	22,33	15,48	10,45	
1972	t-1-1	4	2	6	42,61	29,75	26,00	
1973	t-1-1	4	2	6	43,18	28,81	25,71	
1974	t-1-1	4	2	6	42,22	25,44	24,73	
1975	t-2-1	4	2	6	37,82	19,89	14,26	
1976	t-2-1	4	2	6	37,22	21,37	12,71	
1977	t-2-1	4	2	6	37,30	22,10	15,43	
1978	t-3-1	4	2	6	27,56	14,65	8,72	

1979	t-3-1	4	2	6	28,63	17,04	10,44	
1980	t-3-1	4	2	6	28,83	18,63	10,52	
1981	c-1-2	4	2	6	26,35	320,46	99,73	
1982	c-1-2	4	2	6	25,26	298,03	94,01	
1983	c-1-2	4	2	6	24,05	305,10	97,26	
1984	t-1-2	4	2	6	23,69	300,57	94,28	
1985	t-1-2	4	2	6	23,47	298,64	93,66	
1986	t-1-2	4	2	6	23,30	300,81	97,01	
1987	t-2-2	4	2	6	21,78	295,17	90,81	
1988	t-2-2	4	2	6	22,02	296,01	93,56	
1989	t-2-2	4	2	6	22,80	297,59	92,18	
1990	t-3-2	4	2	6	21,79	295,88	94,87	
1991	t-3-2	4	2	6	21,56	290,76	93,66	
1992	t-3-2	4	2	6	21,51	286,59	91,88	
1993	c-1-3A	4	2	6	1,48	10,78	48,96	38,77
1994	c-1-3A	4	2	6	1,55	8,84	45,68	43,93
1995	c-1-3A	4	2	6	1,65	14,80	44,29	39,26
1996	c-1-3B	4	2	6	13,06	24,61	13,21	49,12
1997	c-1-3B	4	2	6	14,03	22,21	12,97	50,80
1998	c-1-3B	4	2	6	15,57	24,90	13,92	45,62
1999	t-1-3A	4	2	6	0,56	7,73	65,81	25,91
2000	t-1-3A	4	2	6	0,65	8,46	65,76	25,14
2001	t-1-3A	4	2	6	0,63	8,71	63,37	27,29
2002	t-1-3B	4	2	6	8,87	27,41	23,53	40,19
2003	t-1-3B	4	2	6	9,66	27,30	24,55	38,48
2004	t-1-3B	4	2	6	6,78	31,44	19,96	41,81
2005	t-2-3A	4	2	6	0,81	8,77	65,51	24,92
2006	t-2-3A	4	2	6	0,73	9,55	64,29	25,44
2007	t-2-3A	4	2	6	0,63	10,28	64,24	24,86
2008	t-2-3B	4	2	6	9,60	33,11	18,11	39,18
2009	t-2-3B	4	2	6	8,75	33,46	18,28	39,51
2010	t-2-3B	4	2	6	11,48	30,72	19,08	38,72
2011	t-3-3A	4	2	6	0,79	11,37	57,32	30,52
2012	t-3-3A	4	2	6	0,85	14,10	52,84	32,21
2013	t-3-3A	4	2	6	0,93	11,46	54,05	33,55
2014	t-3-3B	4	2	6	7,74	36,09	14,43	41,74
2015	t-3-3B	4	2	6	10,09	35,39	13,08	41,44
2016	t-3-3B	4	2	6	10,43	31,57	15,65	42,35
2017	c-1-1	4	2	7	33,83	16,91	9,09	
2018	c-1-1	4	2	7	34,70	18,44	10,16	
2019	c-1-1	4	2	7	27,33	14,43	8,02	
2020	t-1-1	4	2	7	52,85	22,68	13,78	
2021	t-1-1	4	2	7	52,43	25,56	17,24	
2022	t-1-1	4	2	7	54,22	24,40	17,65	

2023	t-2-1	4	2	7	45,81	17,97	10,38	
2024	t-2-1	4	2	7	45,39	19,08	10,09	
2025	t-2-1	4	2	7	42,38	19,23	9,56	
2026	t-3-1	4	2	7	30,30	12,89	6,90	
2027	t-3-1	4	2	7	31,62	10,92	5,59	
2028	t-3-1	4	2	7	32,79	14,18	7,01	
2029	c-1-2	4	2	7	11,74	289,30	83,14	
2030	c-1-2	4	2	7	11,85	269,91	79,28	
2031	c-1-2	4	2	7	11,88	270,04	76,03	
2032	t-1-2	4	2	7	9,44	261,46	74,22	
2033	t-1-2	4	2	7	9,60	267,60	73,17	
2034	t-1-2	4	2	7	9,89	261,65	71,99	
2035	t-2-2	4	2	7	9,07	257,71	71,50	
2036	t-2-2	4	2	7	10,41	263,18	72,97	
2037	t-2-2	4	2	7	10,83	266,67	77,22	
2038	t-3-2	4	2	7	10,66	266,50	78,48	
2039	t-3-2	4	2	7	9,91	267,13	77,03	
2040	t-3-2	4	2	7	10,30	254,65	71,53	
2041	c-1-3A	4	2	7	1,20	9,94	50,13	38,73
2042	c-1-3A	4	2	7	1,35	13,87	47,72	37,06
2043	c-1-3A	4	2	7	1,30	11,33	46,20	41,18
2044	c-1-3B	4	2	7	15,35	24,62	14,48	45,55
2045	c-1-3B	4	2	7	14,79	29,33	14,21	41,67
2046	c-1-3B	4	2	7	13,55	26,18	13,59	46,68
2047	t-1-3A	4	2	7	0,70	8,59	67,62	23,08
2048	t-1-3A	4	2	7	0,70	8,14	70,64	20,51
2049	t-1-3A	4	2	7	0,89	7,70	71,90	19,51
2050	t-1-3B	4	2	7	5,70	26,41	28,62	39,27
2051	t-1-3B	4	2	7	8,11	25,54	29,62	36,73
2052	t-1-3B	4	2	7	9,09	29,06	27,35	34,49
2053	t-2-3A	4	2	7	0,68	11,23	64,62	23,48
2054	t-2-3A	4	2	7	0,59	11,47	68,89	19,06
2055	t-2-3A	4	2	7	0,64	10,02	67,93	21,41
2056	t-2-3B	4	2	7	5,57	35,12	21,05	38,26
2057	t-2-3B	4	2	7	6,32	36,70	22,23	34,75
2058	t-2-3B	4	2	7	9,31	36,30	19,89	34,51
2059	t-3-3A	4	2	7	0,99	12,98	54,10	31,94
2060	t-3-3A	4	2	7	0,45	13,31	51,99	34,24
2061	t-3-3A	4	2	7	0,87	16,55	52,76	29,82
2062	t-3-3B	4	2	7	5,41	31,80	17,98	44,81
2063	t-3-3B	4	2	7	6,16	32,97	16,57	44,30
2064	t-3-3B	4	2	7	9,40	37,27	15,58	37,75
2065	c-1-1	4	2	8	31,58	28,17	25,06	
2066	c-1-1	4	2	8	28,42	28,70	23,44	

2067	c-1-1	4	2	8	27,48	28,72	25,64	
2068	t-1-1	4	2	8	48,73	49,64	46,48	
2069	t-1-1	4	2	8	50,37	49,68	47,52	
2070	t-1-1	4	2	8	50,32	46,17	46,69	
2071	t-2-1	4	2	8	53,84	43,72	39,18	
2072	t-2-1	4	2	8	50,22	40,77	34,64	
2073	t-2-1	4	2	8	52,07	43,61	35,33	
2074	t-3-1	4	2	8	41,43	35,30	25,42	
2075	t-3-1	4	2	8	40,49	33,84	26,41	
2076	t-3-1	4	2	8	38,86	31,08	26,78	
2077	c-1-2	4	2	8	8,47	294,21	68,16	
2078	c-1-2	4	2	8	9,49	285,16	69,66	
2079	c-1-2	4	2	8	9,87	280,64	71,75	
2080	t-1-2	4	2	8	4,16	285,67	67,84	
2081	t-1-2	4	2	8	4,29	286,16	68,36	
2082	t-1-2	4	2	8	5,05	292,15	71,66	
2083	t-2-2	4	2	8	5,69	281,59	69,03	
2084	t-2-2	4	2	8	3,75	281,21	69,42	
2085	t-2-2	4	2	8	4,19	280,76	66,47	
2086	t-3-2	4	2	8	3,10	289,61	68,47	
2087	t-3-2	4	2	8	5,16	279,67	69,31	
2088	t-3-2	4	2	8	4,89	283,21	72,45	
2089	c-1-3A	4	2	8	4,15	7,98	61,63	26,24
2090	c-1-3A	4	2	8	4,05	8,85	63,50	23,60
2091	c-1-3A	4	2	8	5,17	7,90	61,65	25,28
2092	c-1-3B	4	2	8	36,92	14,53	18,45	30,10
2093	c-1-3B	4	2	8	38,93	14,95	17,00	29,12
2094	c-1-3B	4	2	8	38,99	13,45	17,60	29,96
2095	t-1-3A	4	2	8	1,31	3,10	85,38	10,21
2096	t-1-3A	4	2	8	1,27	3,28	84,74	10,70
2097	t-1-3A	4	2	8	1,19	3,07	85,52	10,22
2098	t-1-3B	4	2	8	40,18	14,29	30,21	15,32
2099	t-1-3B	4	2	8	38,31	12,74	32,07	16,88
2100	t-1-3B	4	2	8	36,99	11,69	34,78	16,53
2101	t-2-3A	4	2	8	1,60	5,18	80,21	13,01
2102	t-2-3A	4	2	8	1,14	4,96	79,02	14,88
2103	t-2-3A	4	2	8	1,44	6,42	77,48	14,67
2104	t-2-3B	4	2	8	33,81	18,38	26,79	21,02
2105	t-2-3B	4	2	8	31,54	20,89	25,37	22,19
2106	t-2-3B	4	2	8	30,10	24,30	23,73	21,86
2107	t-3-3A	4	2	8	1,99	7,01	74,13	16,87
2108	t-3-3A	4	2	8	2,33	6,22	74,19	17,26
2109	t-3-3A	4	2	8	2,51	7,04	74,32	16,13
2110	t-3-3B	4	2	8	29,15	21,44	22,26	27,15

2111	t-3-3B	4	2	8	24,33	20,31	26,41	28,95
2112	t-3-3B	4	2	8	26,52	19,96	27,96	25,56
2113	c-1-1	4	3	9	42,58	43,31	37,61	
2114	c-1-1	4	3	9	42,77	44,29	37,18	
2115	c-1-1	4	3	9	42,47	42,89	36,62	
2116	t-1-1	4	3	9	46,12	46,52	43,67	
2117	t-1-1	4	3	9	44,64	43,57	41,56	
2118	t-1-1	4	3	9	46,98	45,52	44,45	
2119	t-2-1	4	3	9	47,89	43,42	40,47	
2120	t-2-1	4	3	9	48,66	44,63	39,46	
2121	t-2-1	4	3	9	44,57	41,71	38,28	
2122	t-3-1	4	3	9	38,18	38,25	33,02	
2123	t-3-1	4	3	9	40,37	40,21	33,64	
2124	t-3-1	4	3	9	40,38	38,43	32,14	
2125	c-1-2	4	3	9	3,83	278,75	60,53	
2126	c-1-2	4	3	9	3,28	251,43	51,71	
2127	c-1-2	4	3	9	4,03	254,20	54,30	
2128	t-1-2	4	3	9	3,74	253,80	54,07	
2129	t-1-2	4	3	9	3,80	256,32	57,16	
2130	t-1-2	4	3	9	3,53	254,30	55,93	
2131	t-2-2	4	3	9	3,87	257,96	53,66	
2132	t-2-2	4	3	9	3,54	253,49	53,92	
2133	t-2-2	4	3	9	3,75	253,58	55,32	
2134	t-3-2	4	3	9	3,09	250,63	51,83	
2135	t-3-2	4	3	9	3,34	256,30	55,24	
2136	t-3-2	4	3	9	3,52	249,70	55,55	
2137	c-1-3A	4	3	9	1,47	3,30	73,31	21,92
2138	c-1-3A	4	3	9	1,74	5,00	67,01	26,25
2139	c-1-3A	4	3	9	1,43	5,17	68,74	24,67
2140	c-1-3B	4	3	9	30,80	15,32	23,37	30,61
2141	c-1-3B	4	3	9	21,57	17,15	24,45	36,83
2142	c-1-3B	4	3	9	28,95	18,42	22,13	30,50
2143	t-1-3A	4	3	9	0,40	2,49	81,19	15,92
2144	t-1-3A	4	3	9	0,72	4,12	76,18	18,97
2145	t-1-3A	4	3	9	0,50	3,09	80,20	16,22
2146	t-1-3B	4	3	9	22,04	14,92	38,37	24,67
2147	t-1-3B	4	3	9	12,54	17,92	37,66	31,88
2148	t-1-3B	4	3	9	17,21	18,22	36,33	28,25
2149	t-2-3A	4	3	9	0,83	3,66	76,79	18,72
2150	t-2-3A	4	3	9	0,67	3,66	78,96	16,70
2151	t-2-3A	4	3	9	0,74	3,89	77,35	18,02
2152	t-2-3B	4	3	9	16,67	20,48	32,08	30,77
2153	t-2-3B	4	3	9	16,96	22,64	32,37	28,03
2154	t-2-3B	4	3	9	12,94	21,95	32,72	32,39

2155	t-3-3A	4	3	9	0,87	4,62	72,95	21,57
2156	t-3-3A	4	3	9	1,21	5,19	72,29	21,31
2157	t-3-3A	4	3	9	1,08	5,45	70,96	22,51
2158	t-3-3B	4	3	9	18,75	22,10	25,43	33,72
2159	t-3-3B	4	3	9	19,73	25,30	24,64	30,33
2160	t-3-3B	4	3	9	16,00	24,60	24,10	35,30
2161	c-1-1	4	3	10	31,48	30,58	20,43	
2162	c-1-1	4	3	10	29,09	22,74	15,58	
2163	c-1-1	4	3	10	31,80	26,43	18,53	
2164	t-1-1	4	3	10	43,57	40,46	31,82	
2165	t-1-1	4	3	10	43,15	40,40	32,71	
2166	t-1-1	4	3	10	42,88	39,12	33,00	
2167	t-2-1	4	3	10	46,67	45,04	31,25	
2168	t-2-1	4	3	10	46,78	46,75	32,48	
2169	t-2-1	4	3	10	46,03	38,64	28,95	
2170	t-3-1	4	3	10	39,47	36,31	25,44	
2171	t-3-1	4	3	10	42,41	34,28	24,54	
2172	t-3-1	4	3	10	39,26	32,59	21,83	
2173	c-1-2	4	3	10	6,44	237,56	59,07	
2174	c-1-2	4	3	10	4,75	206,67	49,66	
2175	c-1-2	4	3	10	5,57	218,65	55,92	
2176	t-1-2	4	3	10	5,28	228,18	57,66	
2177	t-1-2	4	3	10	5,66	223,33	56,90	
2178	t-1-2	4	3	10	5,51	230,58	53,37	
2179	t-2-2	4	3	10	6,42	231,59	62,74	
2180	t-2-2	4	3	10	5,69	235,86	63,31	
2181	t-2-2	4	3	10	5,48	238,61	60,40	
2182	t-3-2	4	3	10	5,75	237,62	59,64	
2183	t-3-2	4	3	10	5,30	242,33	65,62	
2184	t-3-2	4	3	10	4,86	250,47	63,29	
2185	c-1-3A	4	3	10	2,30	7,20	60,60	29,90
2186	c-1-3A	4	3	10	2,50	8,76	57,93	30,81
2187	c-1-3A	4	3	10	3,42	9,91	56,27	30,40
2188	c-1-3B	4	3	10	39,83	17,48	11,00	31,68
2189	c-1-3B	4	3	10	32,34	19,85	11,67	36,14
2190	c-1-3B	4	3	10	33,38	20,90	12,33	33,38
2191	t-1-3A	4	3	10	1,52	4,05	77,15	17,27
2192	t-1-3A	4	3	10	1,89	4,71	77,43	15,97
2193	t-1-3A	4	3	10	1,54	4,76	71,18	22,52
2194	t-1-3B	4	3	10	20,04	26,27	26,27	27,43
2195	t-1-3B	4	3	10	25,10	24,53	24,98	25,39
2196	t-1-3B	4	3	10	19,91	25,64	25,16	29,29
2197	t-2-3A	4	3	10	2,16	5,56	72,67	19,60
2198	t-2-3A	4	3	10	2,67	5,60	70,34	21,39

2199	t-2-3A	4	3	10	2,69	4,97	73,92	18,42
2200	t-2-3B	4	3	10	23,71	21,02	21,98	33,29
2201	t-2-3B	4	3	10	23,68	20,44	23,43	32,45
2202	t-2-3B	4	3	10	21,35	24,87	22,55	31,23
2203	t-3-3A	4	3	10	3,75	7,73	66,97	21,55
2204	t-3-3A	4	3	10	2,69	8,28	66,20	22,83
2205	t-3-3A	4	3	10	3,31	7,87	65,15	23,67
2206	t-3-3B	4	3	10	26,17	20,88	18,17	34,78
2207	t-3-3B	4	3	10	21,80	25,75	16,92	35,54
2208	t-3-3B	4	3	10	22,36	22,96	17,99	36,69
2209	c-1-1	4	3	11	32,04	31,85	28,98	
2210	c-1-1	4	3	11	33,34	36,71	31,82	
2211	c-1-1	4	3	11	30,91	33,32	29,60	
2212	t-1-1	4	3	11	35,82	36,65	30,78	
2213	t-1-1	4	3	11	36,20	37,34	33,41	
2214	t-1-1	4	3	11	32,32	36,90	31,74	
2215	t-2-1	4	3	11	39,64	42,52	38,58	
2216	t-2-1	4	3	11	37,18	39,17	33,67	
2217	t-2-1	4	3	11	39,90	40,93	39,05	
2218	t-3-1	4	3	11	35,98	35,57	34,42	
2219	t-3-1	4	3	11	41,00	40,87	38,52	
2220	t-3-1	4	3	11	37,90	38,88	33,71	
2221	c-1-2	4	3	11	6,13	271,79	71,56	
2222	c-1-2	4	3	11	5,36	253,27	67,92	
2223	c-1-2	4	3	11	5,86	258,71	72,63	
2224	t-1-2	4	3	11	5,47	259,37	70,98	
2225	t-1-2	4	3	11	5,51	258,92	70,69	
2226	t-1-2	4	3	11	5,17	258,15	67,29	
2227	t-2-2	4	3	11	5,62	259,40	67,47	
2228	t-2-2	4	3	11	5,12	256,72	66,63	
2229	t-2-2	4	3	11	5,45	259,56	69,97	
2230	t-3-2	4	3	11	5,07	255,26	65,86	
2231	t-3-2	4	3	11	4,88	253,95	65,46	
2232	t-3-2	4	3	11	5,01	257,61	71,04	
2233	c-1-3A	4	3	11	2,00	2,87	76,81	18,32
2234	c-1-3A	4	3	11	2,16	3,64	71,98	22,22
2235	c-1-3A	4	3	11	2,47	2,78	74,37	20,37
2236	c-1-3B	4	3	11	43,03	10,24	23,22	23,52
2237	c-1-3B	4	3	11	48,23	9,41	19,54	22,82
2238	c-1-3B	4	3	11	49,47	9,91	19,77	20,85
2239	t-1-3A	4	3	11	0,93	1,38	85,57	12,12
2240	t-1-3A	4	3	11	0,94	1,48	82,27	15,32
2241	t-1-3A	4	3	11	0,68	1,76	87,34	10,22
2242	t-1-3B	4	3	11	24,41	8,50	45,41	21,68

2243	t-1-3B	4	3	11	23,68	10,28	41,97	24,07
2244	t-1-3B	4	3	11	26,14	10,12	42,49	21,25
2245	t-2-3A	4	3	11	1,07	2,36	82,04	14,54
2246	t-2-3A	4	3	11	0,67	1,81	82,83	14,69
2247	t-2-3A	4	3	11	0,70	2,40	83,54	13,36
2248	t-2-3B	4	3	11	28,54	11,49	33,81	26,15
2249	t-2-3B	4	3	11	24,84	15,80	33,31	26,04
2250	t-2-3B	4	3	11	30,81	12,56	32,71	23,92
2251	t-3-3A	4	3	11	0,87	2,44	78,36	18,32
2252	t-3-3A	4	3	11	1,40	2,48	82,07	14,06
2253	t-3-3A	4	3	11	1,29	2,41	81,44	14,87
2254	t-3-3B	4	3	11	31,68	14,51	26,66	27,15
2255	t-3-3B	4	3	11	39,84	12,83	27,10	20,23
2256	t-3-3B	4	3	11	37,05	11,41	27,65	23,89
2257	c-1-1	4	3	12	35,38	34,68	29,16	
2258	c-1-1	4	3	12	35,27	35,28	27,39	
2259	c-1-1	4	3	12	33,29	33,80	27,77	
2260	t-1-1	4	3	12	44,98	48,94	44,78	
2261	t-1-1	4	3	12	47,15	50,28	45,69	
2262	t-1-1	4	3	12	43,41	48,44	43,74	
2263	t-2-1	4	3	12	45,81	44,55	35,23	
2264	t-2-1	4	3	12	44,13	42,64	32,15	
2265	t-2-1	4	3	12	48,02	46,49	39,60	
2266	t-3-1	4	3	12	46,23	41,93	31,32	
2267	t-3-1	4	3	12	46,03	40,78	31,48	
2268	t-3-1	4	3	12	45,31	41,19	27,02	
2269	c-1-2	4	3	12	2,68	246,02	45,33	
2270	c-1-2	4	3	12	2,99	226,78	43,82	
2271	c-1-2	4	3	12	2,95	232,13	46,01	
2272	t-1-2	4	3	12	2,87	252,80	51,49	
2273	t-1-2	4	3	12	2,82	244,04	48,23	
2274	t-1-2	4	3	12	2,48	251,01	49,81	
2275	t-2-2	4	3	12	3,22	247,93	51,32	
2276	t-2-2	4	3	12	2,24	249,89	47,52	
2277	t-2-2	4	3	12	3,34	247,41	52,16	
2278	t-3-2	4	3	12	3,03	250,50	49,62	
2279	t-3-2	4	3	12	2,50	249,24	48,69	
2280	t-3-2	4	3	12	3,16	249,25	46,81	
2281	c-1-3A	4	3	12	3,12	2,68	82,56	11,65
2282	c-1-3A	4	3	12	4,11	2,62	83,53	9,74
2283	c-1-3A	4	3	12	4,41	3,08	81,43	11,08
2284	c-1-3B	4	3	12	43,65	14,83	16,06	25,45
2285	c-1-3B	4	3	12	43,15	19,73	13,19	23,93
2286	c-1-3B	4	3	12	46,26	16,81	14,17	22,76

2287	t-1-3A	4	3	12	2,24	2,31	83,57	11,87
2288	t-1-3A	4	3	12	2,64	2,64	81,65	13,06
2289	t-1-3A	4	3	12	1,84	2,31	86,12	9,74
2290	t-1-3B	4	3	12	41,56	15,23	23,87	19,35
2291	t-1-3B	4	3	12	44,74	15,10	21,36	18,79
2292	t-1-3B	4	3	12	41,26	17,47	22,30	18,97
2293	t-2-3A	4	3	12	5,04	4,65	78,12	12,19
2294	t-2-3A	4	3	12	5,35	5,39	75,90	13,36
2295	t-2-3A	4	3	12	5,94	4,44	77,98	11,68
2296	t-2-3B	4	3	12	37,64	21,55	18,06	22,69
2297	t-2-3B	4	3	12	35,75	24,07	17,02	23,16
2298	t-2-3B	4	3	12	40,32	19,34	17,99	22,35
2299	t-3-3A	4	3	12	11,16	7,34	65,76	15,73
2300	t-3-3A	4	3	12	13,24	8,46	61,89	16,41
2301	t-3-3A	4	3	12	10,82	8,92	61,98	18,29
2302	t-3-3B	4	3	12	33,88	17,88	19,81	25,43
2303	t-3-3B	4	3	12	35,90	20,79	17,97	25,34
2304	t-3-3B	4	3	12	38,26	16,49	20,79	24,46

3.2 Estudio estadístico

A continuación se exponen los resultados del análisis estadístico para los tres experimentos: A. Viabilidad, B. Fragmentación, y C. Acrosoma.

A. Viabilidad

Se han considerado los siguientes factores:

- un factor inter-sujetos: **Raza**, con 3 niveles: raza frisona (1), raza limusina (2), y raza rubia gallega (3).
- tres factores intra-sujetos:
 - * **Tiempo**, con 3 niveles: mediciones a los 0 minutos (1), 60 minutos (2), y 120 minutos (3).
 - * **Tratamiento**, con 4 niveles: sin tratamiento (1), dosis de 2 mg (2), dosis de 1 mg (3), y dosis de 0,5 mg (4).
 - * **Periodo**, con 4 niveles: del 7 al 21 de noviembre de 2011 (1), del 9 al 16 de enero de 2012 (2), del 30 de enero al 13 de febrero de 2012 (3), y del 12 al 26 de marzo de 2012 (4).

Para cada combinación **Tiempo-Tratamiento-Periodo** se dispone de un total de 36 mediciones, 12 para cada raza (4 toros por raza y 3 medidas para cada toro).

En primer lugar se ha considerado la condición de **esfericidad** (igualdad de matrices de dispersión) para determinar si se dan las condiciones para utilizar la prueba F al contrastar los factores intra-sujetos. Para ello se ha aplicado el test de Mauchly, cuyos resultados se muestran en la **Tabla E1**.

De acuerdo con la columna **Significación**, se rechaza la condición de esfericidad, pues el valor más alto es 0,001 ($<0,05$).

A continuación la **Tabla E2** recoge los resultados de las pruebas de los efectos intra-sujetos. De acuerdo con la columna **Significación** (omitiendo las filas de **Esfericidad asumida** por no cumplirse esta condición), se puede concluir que no sólo las interacciones de los factores **Periodo**, **Tratamiento** y **Tiempo** sino también los propios factores producen un efecto significativo en las respuestas observadas, ya que los niveles de significación obtenidos son prácticamente todos ellos $<0,05$.

Tabla E1 Prueba de esfericidad de Mauchly^b

Efecto intra-sujetos	W de Mauchy	Chi-cuadrado	gl	Significación	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Periodo	,528	20,264	5	,001	,783	,897	,333
tratamiento	,256	43,171	5	,000	,531	,588	,333
tiempo	,550	19,157	2	,000	,689	,753	,500
periodo * tratamiento	,037	97,879	44	,000	,577	,740	,111
periodo * tiempo	,065	84,180	20	,000	,598	,720	,167
tratamiento * tiempo	,164	55,706	20	,000	,576	,690	,167
periodo * tratamiento * tiempo	,000	401,656		,000	,300	,388	,056

Contrasta la hipótesis nula de que la matriz de covarianza error de las variables dependientes transformadas es proporcional a una matriz identidad.

^a Puede usarse para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas. Las pruebas corregidas se muestran en la tabla Pruebas de los efectos inter-sujetos.

^b Diseño: Intersección+raza

Diseño intra sujetos: periodo+tratamiento+tiempo

*tratamiento+periodo*tiempo+tratamiento*tiempo+periodo*tratamiento*tiempo

Tabla E2 Pruebas de los efectos intra-sujetos

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Periodo	Esfericidad asumida	22064,601	3	7354,867	17,016	,000	,340
	Greenhouse-Geisser	22064,601	2,348	9397,844	17,016	,000	,340
	Huynh-Feldt	22064,601	2,692	8195,716	17,016	,000	,340
	Límite-inferior	22064,601	1,000	22064,601	17,016	,000	,340
Periodo * raza	Esfericidad asumida	21742,552	6	3623,759	8,384	,000	,337
	Greenhouse-Geisser	21742,552	4,696	4630,338	8,384	,000	,337
	Huynh-Feldt	21742,552	5,384	4038,047	8,384	,000	,337
	Límite-inferior	21742,552	2,000	10871,276	8,384	,001	,337
Error (periodo)	Esfericidad asumida	42791,596	99	432,238			
	Greenhouse-Geisser	42791,596	77,479	552,302			
	Huynh-Feldt	42791,596	88,843	481,654			
	Límite-inferior	42791,596	33,000	1296,715			
Tratamiento	Esfericidad asumida	10791,612	3	3597,204	81,581	,000	,712
	Greenhouse-Geisser	10791,612	1,594	6772,230	81,581	,000	,712
	Huynh-Feldt	10791,612	1,763	6121,529	81,581	,000	,712
	Límite-inferior	10791,612	1,000	10791,612	81,581	,000	,712

Tratamiento * raza	Esfericidad asumida	1338,872	6	432,238	5,061	,000	,235
	Greenhouse-Geisser	1338,872	3,187	552,302	5,061	,003	,235
	Huynh-Feldt	1338,872	3,526	481,654	5,061	,002	,235
	Límite-inferior	1338,872	2,000	1296,715	5,061	,012	,235
Error (tratamiento)	Esfericidad asumida	4365,278	99	3597,204			
	Greenhouse-Geisser	4365,278	52,586	6772,230			
	Huynh-Feldt	4365,278	58,176	6121,529			
	Límite-inferior	4365,278	33,000	10791,612			
Tiempo	Esfericidad asumida	21943,419	2	223,145	161,164	,000	,830
	Greenhouse-Geisser	21943,419	1,379	420,102	161,164	,000	,830
	Huynh-Feldt	21943,419	1,507	379,737	161,164	,000	,830
	Límite-inferior	21943,419	1,000	669,436	161,164	,000	,830
Tiempo * raza	Esfericidad asumida	1558,928	4	389,732	5,725	,001	,258
	Greenhouse-Geisser	1558,928	2,758	565,285	5,725	,003	,258
	Huynh-Feldt	1558,928	3,013	517,371	5,725	,002	,258
	Límite-inferior	1558,928	2,000	779,464	5,725	,007	,258
Error (tiempo)	Esfericidad asumida	4493,138	66	68,078			
	Greenhouse-Geisser	4493,138	45,503	98,743			
	Huynh-Feldt	4493,138	49,717	90,374			
	Límite-inferior	4493,138	33,000	136,156			
Periodo * tratamiento	Esfericidad asumida	2901,810	9	322,423	18,450	,000	,359
	Greenhouse-Geisser	2901,810	5,197	558,391	18,450	,000	,359
	Huynh-Feldt	2901,810	6,657	435,913	18,450	,000	,359
	Límite-inferior	2901,810	1,000	2901,810	18,450	,000	,359

Periodo * tratamiento * raza	Esfericidad asumida	2454,899	18	136,383	7,804	,000	,321
	Greenhouse-Geisser	2454,899	10,393	236,196	7,804	,000	,321
	Huynh-Feldt	2454,899	13,314	184,389	7,804	,000	,321
	Límite-inferior	2454,899	2,000	1227,450	7,804	,002	,321
Error(Periodo * tratamiento)	Esfericidad asumida	5190,121	297	17,475			
	Greenhouse-Geisser	5190,121	171,492	30,264			
	Huynh-Feldt	5190,121	219,676	23,626			
	Límite-inferior	5190,121	33,000	157,276			
Periodo * tiempo	Esfericidad asumida	494,414	6	82,402	6,288	,000	,160
	Greenhouse-Geisser	494,414	3,587	137,849	6,288	,000	,160
	Huynh-Feldt	494,414	4,322	114,400	6,288	,000	,160
	Límite-inferior	494,414	1,000	494,414	6,288	,017	,160
Periodo * tiempo * raza	Esfericidad asumida	1491,247	12	124,271	6,288	,000	,365
	Greenhouse-Geisser	1491,247	7,173	207,889	6,288	,000	,365
	Huynh-Feldt	1491,247	8,644	172,526	6,288	,000	,365
	Límite-inferior	1491,247	2,000	745,623	6,288	,001	,365
Error(Periodo * tiempo)	Esfericidad asumida	2594,776	198	13,105			
	Greenhouse-Geisser	2594,776	118,359	21,923			
	Huynh-Feldt	2594,776	142,620	18,194			
	Límite-inferior	2594,776	33,000	78,630			
Tratamiento * tiempo	Esfericidad asumida	848,117	6	141,353	32,518	,000	,496
	Greenhouse-Geisser	848,117	3,454	245,561	32,518	,000	,496
	Huynh-Feldt	848,117	4,141	204,834	32,518	,000	,496

	Límite-inferior	848,117	1,000	48,117	32,518	,000	,496
Tratamiento * tiempo * raza	Esfericidad asumida	179,959	12	14,997	3,450	,000	,173
	Greenhouse-Geisser	179,959	6,908	26,052	3,450	,002	,173
	Huynh-Feldt	179,959	8,281	21,732	3,450	,001	,173
	Límite-inferior	179,959	2,000	89,980	3,450	,044	,173
Error(Tratamiento * tiempo)	Esfericidad asumida	860,867	198	4,347			
	Greenhouse-Geisser	860,867	113,975	7,552			
	Huynh-Feldt	860,867	136,637	6,299			
	Límite-inferior	860,867	33,000	26,081			
Periodo * Tratamiento * tiempo	Esfericidad asumida	175,328	18	9,740	2,909	,000	,081
	Greenhouse-Geisser	175,328	5,403	32,448	2,909	,013	,081
	Huynh-Feldt	175,328	6,976	25,132	2,909	,006	,081
	Límite-inferior	175,328	1,000	175,328	2,909	,097	,081
Periodo * Tratamiento * tiempo	Esfericidad asumida	275,638	36	7,657	2,287	,000	,122
* raza	Greenhouse-Geisser	275,638	10,807	25,506	2,287	,013	,122
	Huynh-Feldt	275,638	13,953	19,755	2,287	,006	,122
	Límite-inferior	275,638	2,000	137,819	2,287	,117	,122
Error(Periodo * Tratamiento	Esfericidad asumida	1988,863	594	3,348			
* tiempo)	Greenhouse-Geisser	1988,863	178,312	11,154			
	Huynh-Feldt	1988,863	230,217	8,639			
	Límite-inferior	1988,863	33,000	60,269			

La **Tabla E3** recoge los resultados de las pruebas de los efectos inter-sujetos debidos al factor **Raza**. Se puede concluir que las diferencias observadas no se deben a este factor (significación $0,644 > 0,05$), sino a la interacción de los factores incluidos en el estudio.

Tabla E3 Pruebas de los efectos inter-sujetos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Intersección	1833351,631	1	1833351,631	752,367	,000	,958
Raza	2170,279	2	1085,140	,445	,644	,026
Error	80413,718	33	2436,779			

La **Tabla E4** muestra las respuestas medias para cada una de las tres razas, junto con los correspondientes intervalos de confianza del 95%.

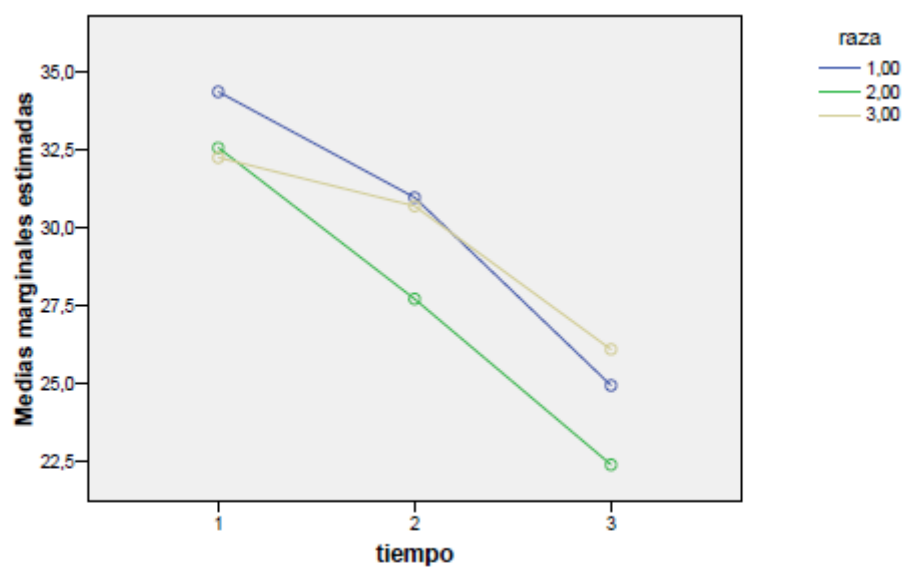
Tabla E4 Estimaciones

raza	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	33,733	2,057	29,549	37,918
2	31,058	2,057	26,873	35,242
3	32,927	2,057	28,742	37,111

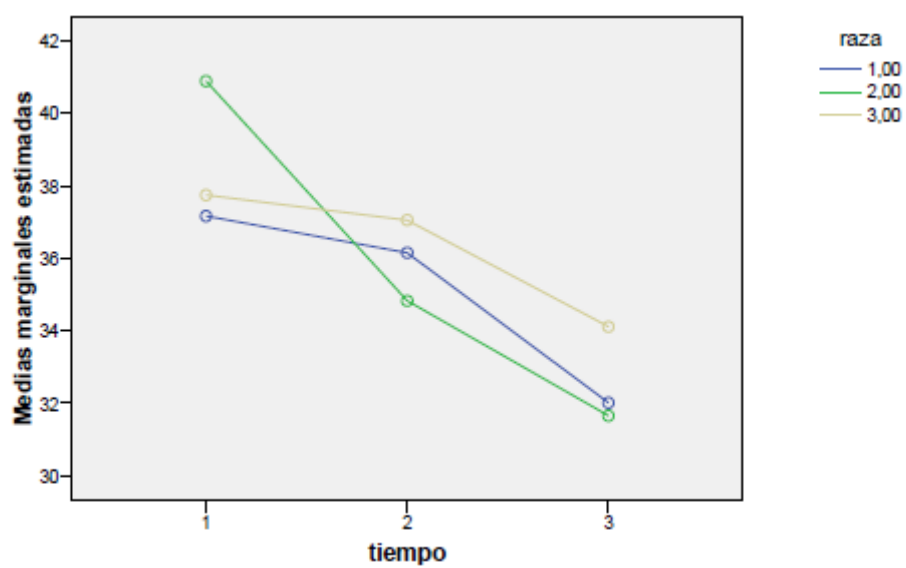
A continuación se presentan las **Gráficas E1, E2, E3 y E4** de perfil correspondientes a la combinación **Tiempo*Raza*Tratamiento**, que muestran el comportamiento de las distintas razas.

Gráfica E1

para el tratamiento 1

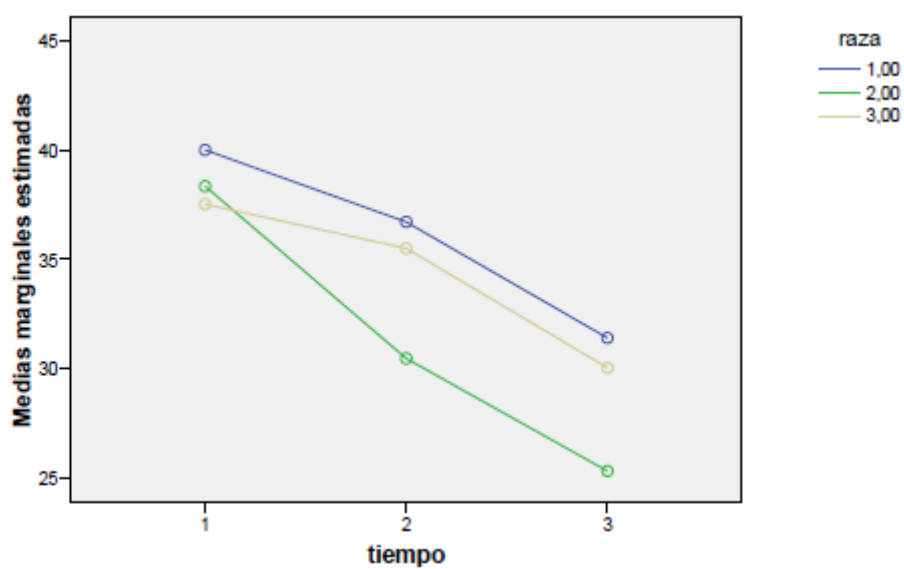
**Gráfica E2**

para el tratamiento 2

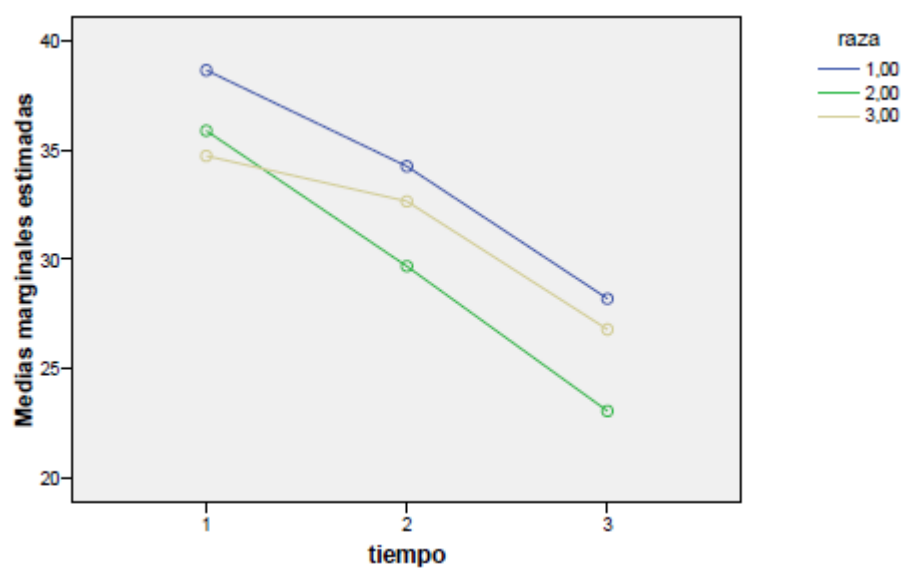


Gráfica 3

para el tratamiento 3

**Gráfica 4**

para el tratamiento 4



A continuación para cada uno de los factores **Tiempo, Tratamiento y Periodo** se presentan las tablas de estimaciones de las respuestas medias (incluyendo intervalos de confianza del 95%).

Dado que se han detectado diferencias significativas entre los niveles de los factores intra-sujetos, se han realizado pruebas de comparaciones por pares, cuyos resultados se ofrecen en las tablas correspondientes.

1. Tiempo

Las **Tablas E5 y E6** ofrecen los resultados de las pruebas generales correspondientes a este factor.

Tabla E5 Estimaciones

Tiempo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	36,677	1,224	34,186	39,168
2	33,053	1,306	30,396	35,710
3	27,988	1,123	25,702	30,273

Tabla E6 Comparaciones por pares

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	3,624*	,447	,000	2,497	4,751
	3	8,689*	,623	,000	7,117	10,261
2	1	-3,624*	,447	,000	-4,751	-2,497
	3	5,065*	,348	,000	4,187	5,943
3	1	-8,689*	,623	,000	-10,261	-7,117
	2	-5,065*	,348	,000	-5,943	-4,187

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05

^a Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni

Los 3 valores son significativamente distintos, observándose un decrecimiento en las respuestas con el paso del tiempo.

La **Tabla E7** muestra las respuestas medias (medias marginales) para cada combinación **tratamiento-tiempo**, así como los correspondientes intervalos de confianza del 95% para dichos promedios.

De los datos de la columna **Media** se deduce que la magnitud de la respuesta a cada tratamiento disminuye con el avance del tiempo.

Para obtener juicios de significación estadística, con un nivel del 5%, basta con observar si se solapan o no los intervalos de confianza presentados en la tabla.

Por ejemplo puede observarse que los intervalos de tratamiento 1 en tiempos 1 y 2 contienen valores comunes, no existiendo por lo tanto una diferencia significativa en este caso.

Sin embargo existe una diferencia significativa entre los tiempos 1 y 2 y el tiempo 3, pues el intervalo no comparte valores con los otros dos.

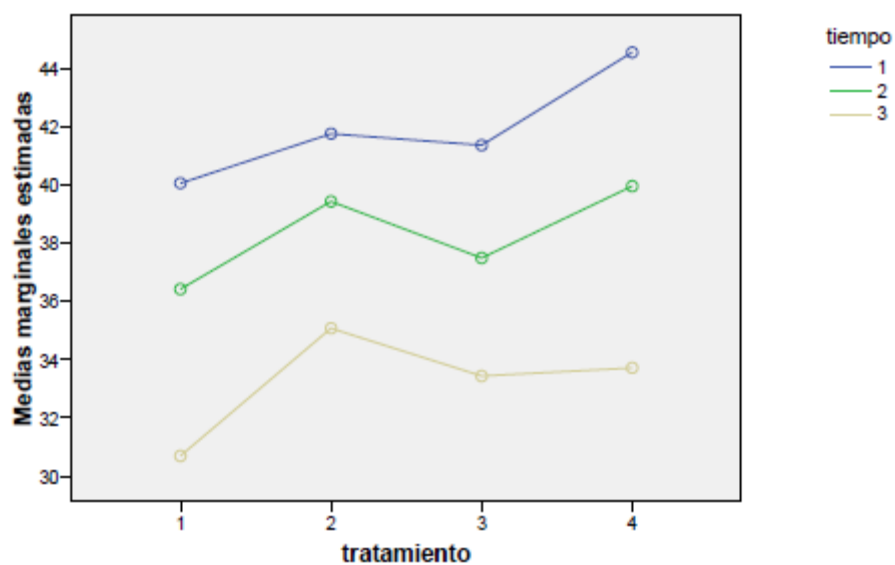
Tabla E7 Estimaciones

tratamiento	tiempo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1	1	33,043	1,207	30,587	35,498
	2	29,775	1,278	27,174	32,375
	3	24,455	1,161	22,093	26,818
2	1	38,599	1,216	36,124	41,073
	2	36,010	1,303	33,358	38,662
	3	32,594	1,197	30,159	35,029
3	1	38,630	1,361	35,860	41,400
	2	34,224	1,383	31,409	37,038
	3	28,900	1,145	26,570	31,229
4	1	36,436	1,243	33,907	38,964
	2	32,203	1,409	29,337	35,069
	3	26,002	1,145	23,673	28,331

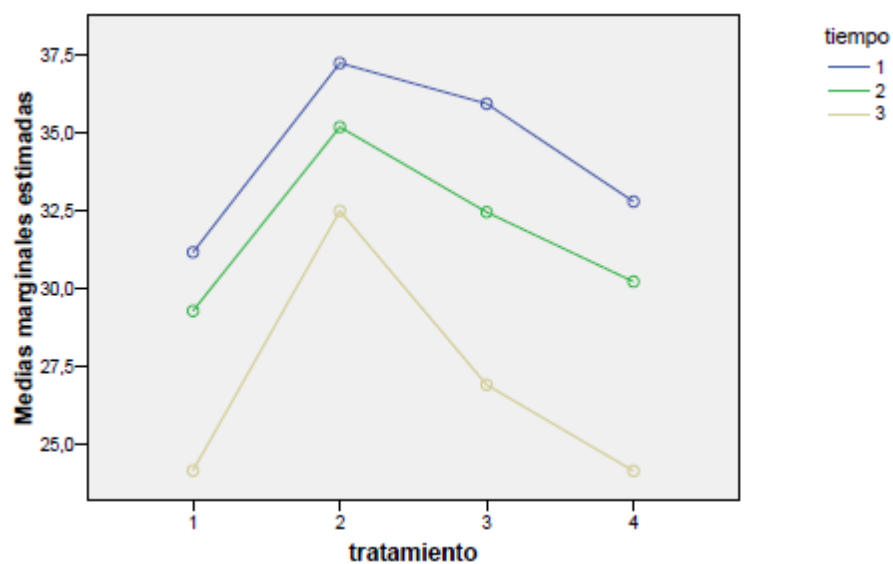
A continuación se presentan las **Gráficas E5, E6, E7 y E8** de perfil correspondientes a la combinación **Tratamiento*Tiempo*Periodo**.

Gráfica E5

para el periodo 1

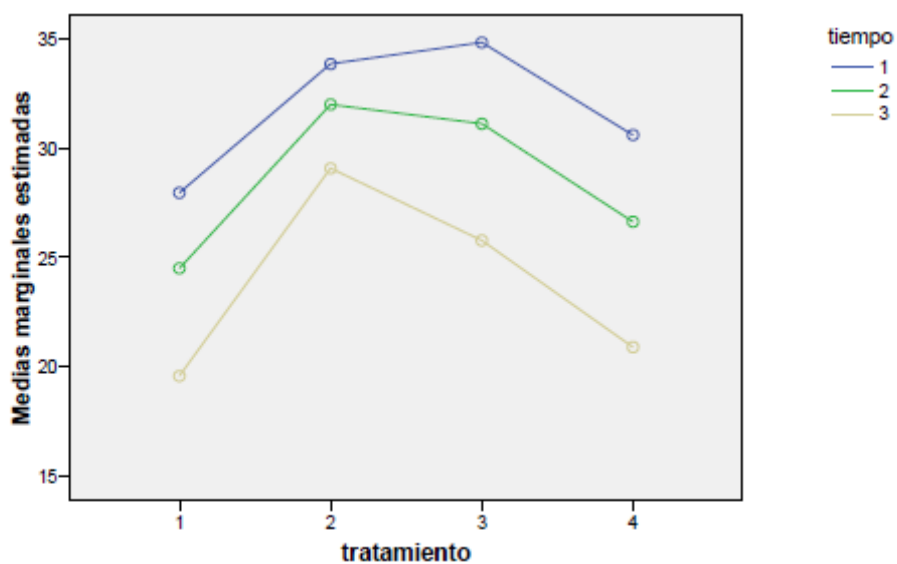
**Gráfica E6**

para el periodo 2

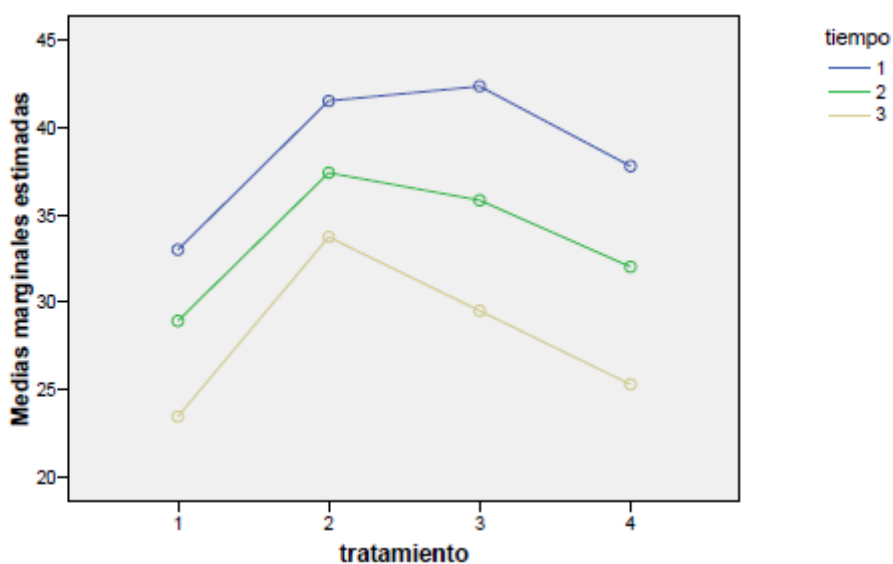


Gráfica E7

para el periodo 3

**Gráfica E8**

para el periodo 4



2. Tratamiento

Las **Tablas E8 y E9** ofrecen los resultados de las pruebas correspondientes a este factor.

Tabla E8 Estimaciones

tratamiento	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	29,091	1,186	26,678	31,504
2	35,734	1,204	33,286	38,183
3	33,918	1,256	31,362	36,473
4	31,547	1,230	29,044	34,050

Tabla E9 Comparaciones por pares

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-6,643*	,590	,000	-8,299	-4,988
	3	-4,827*	,620	,000	-6,567	-3,087
	4	-2,456*	,509	,000	-3,884	-1,028
2	1	6,643*	,590	,000	4,988	8,299
	3	1,817*	,249	,000	1,118	2,515
	4	4,187*	,298	,000	3,352	5,023
3	1	4,827*	,620	,000	3,087	6,567
	2	-1,817*	,249	,000	-2,515	-1,118
	4	2,371*	,289	,000	1,560	3,182
4	1	2,456*	,509	,000	1,028	3,884
	2	-4,187*	,298	,000	-5,023	-3,352
	3	-2,371*	,289	,000	-3,182	-1,560

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05

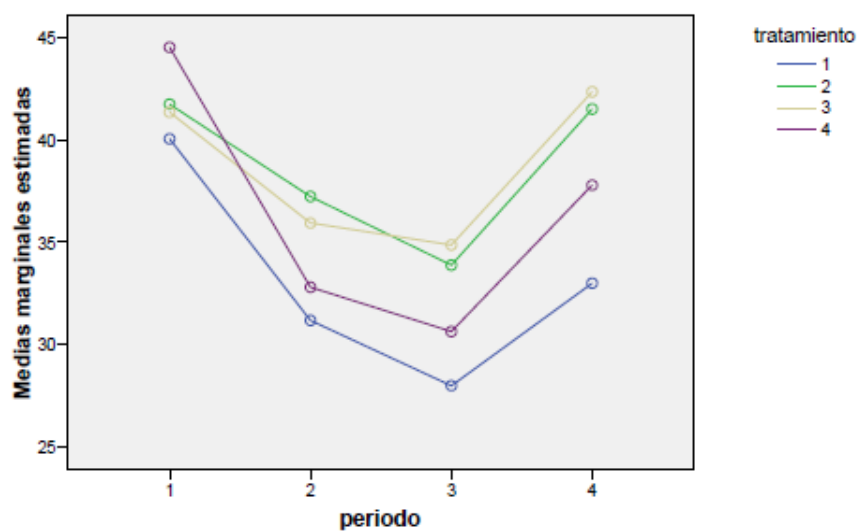
^a Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni

Los 4 tratamientos son significativamente distintos, observándose un decrecimiento en la respuesta en el orden 2>3>4>1.

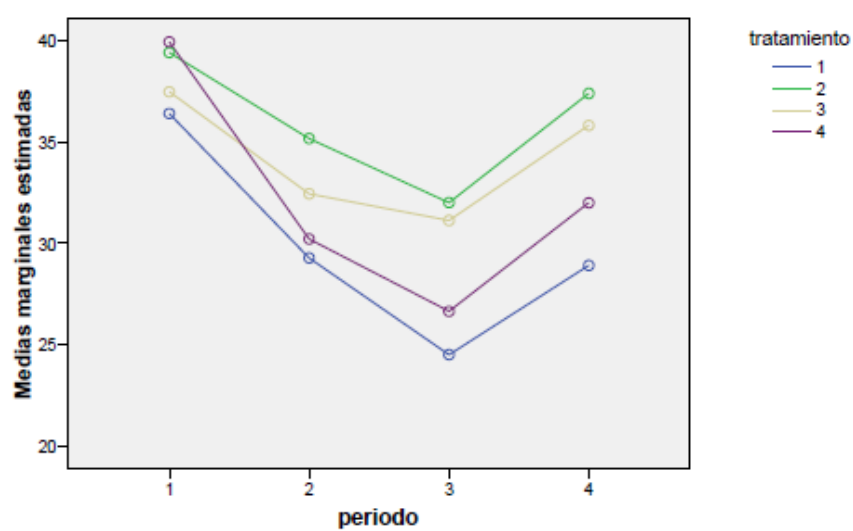
A continuación se presentan las **Gráficas E9, E10 y E11** de perfil correspondientes a la combinación **Periodo*Tratamiento*Tiempo**, que muestran el comportamiento de los distintos tratamientos.

Gráfica E9

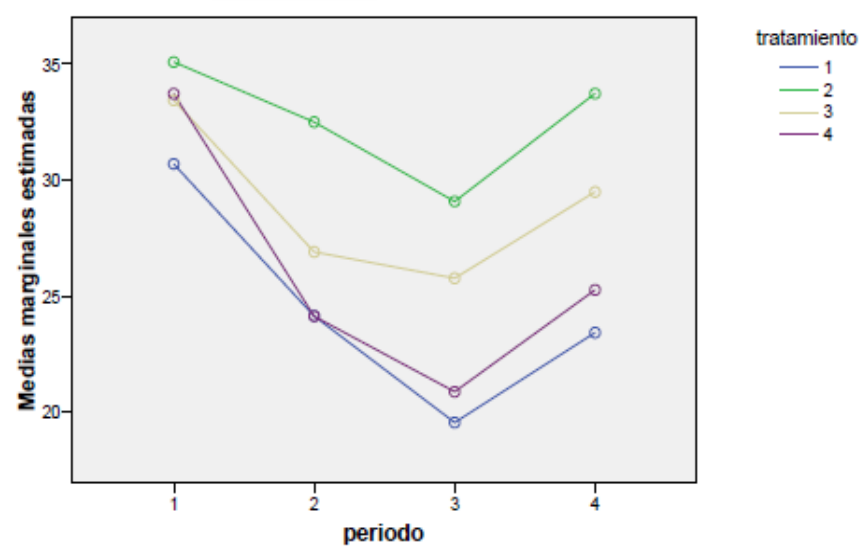
para el tiempo 1

**Gráfica E10**

para el tiempo 2

**Gráfica E11**

para el tiempo 3



3. Periodo

Las **Tablas E10 y E11** ofrecen los resultados de las pruebas correspondientes a este factor.

Tabla E10 Estimaciones

periodo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	37,831	1,354	35,077	40,585
2	30,994	1,883	27,163	34,825
3	28,071	1,362	25,300	30,843
4	33,394	1,187	30,979	35,808

Tabla E11 Comparaciones por pares

(I) periodo	(J) periodo	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	6,837*	1,444	,000	2,785	10,888
	3	9,760*	1,539	,000	5,439	14,080
	4	4,437*	1,476	,030	,294	8,581
2	1	-6,837*	1,444	,000	-10,888	-2,785
	3	2,923	1,350	,226	-,865	6,711
	4	-2,399	1,653	,936	-7,038	2,240
3	1	-9,760*	1,539	,000	-14,080	-5,439
	2	-2,923	1,350	,226	-6,711	,865
	4	-5,322*	,906	,000	-7,866	-2,778
4	1	-4,437*	1,476	,030	-8,581	-,294
	2	2,399	1,653	,936	-2,240	7,038
	3	5,322*	,906	,000	2,778	7,866

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05

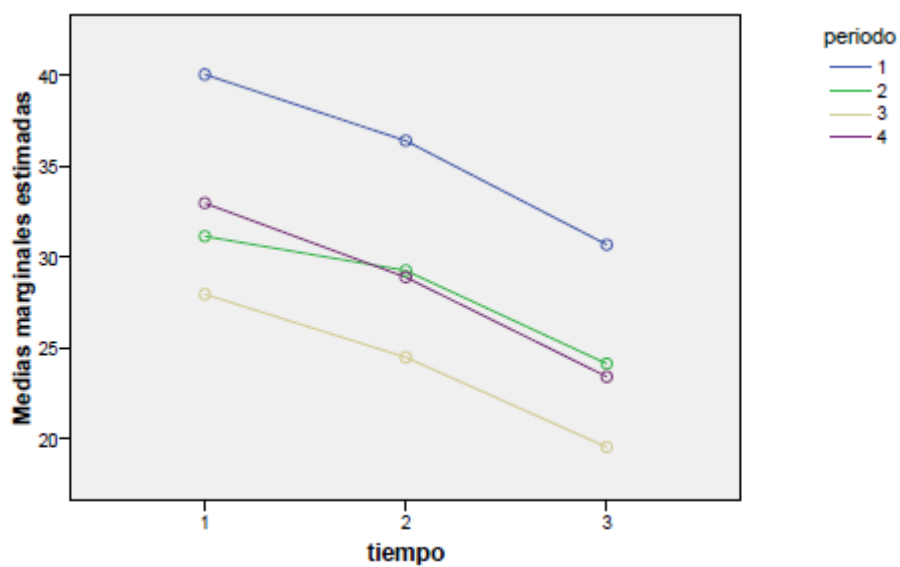
^a Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni

La respuesta es mayor en el periodo 1 (significativamente distinto de los demás), decrece en los periodos 2 y 3 (no significativamente distintos) y repunta en el periodo 4 (significativamente distinto de 1 y 3, pero no de 2).

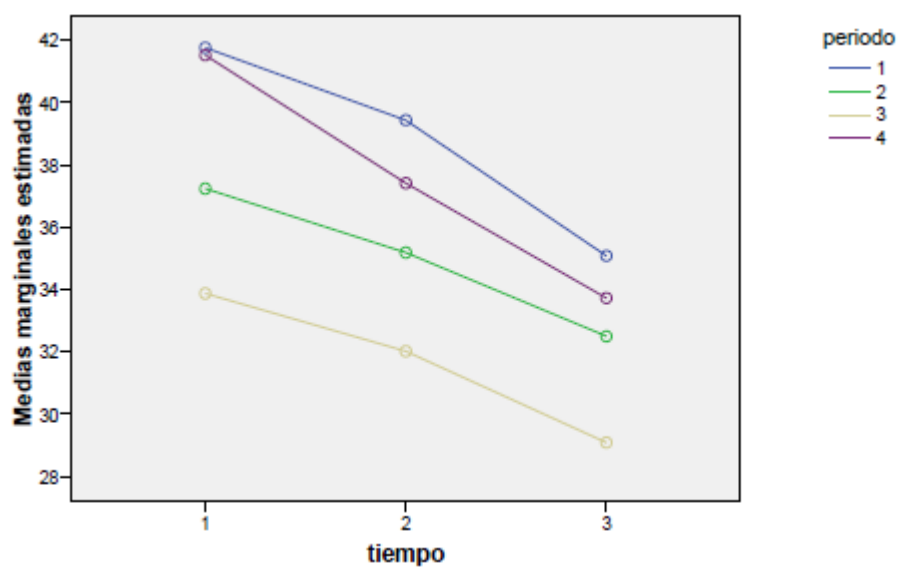
A continuación se presentan las **Gráficas E12, E13, E14 y E15** de perfil correspondientes a la combinación **Tiempo*Periodo*Tratamiento**.

Gráfica E12

para el tratamiento 1

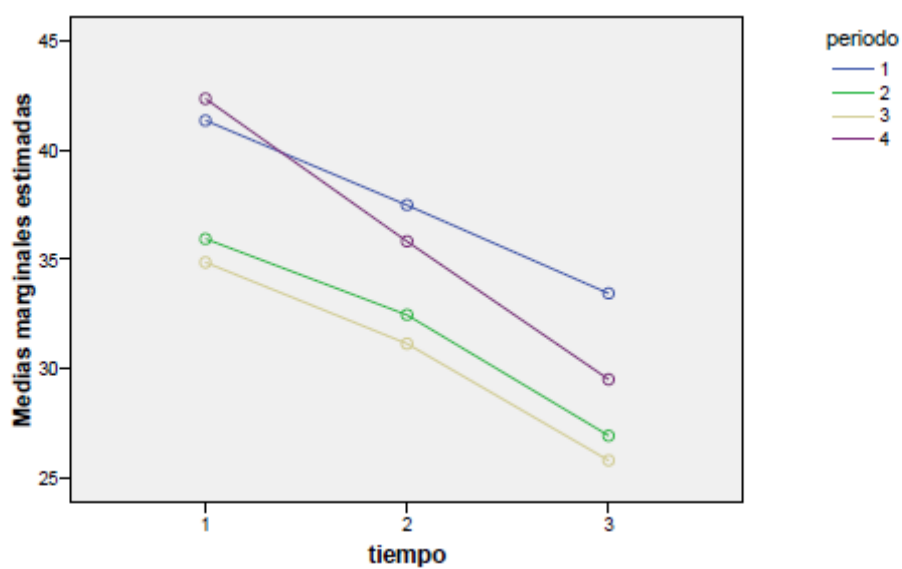
**Gráfica E13**

para el tratamiento 2

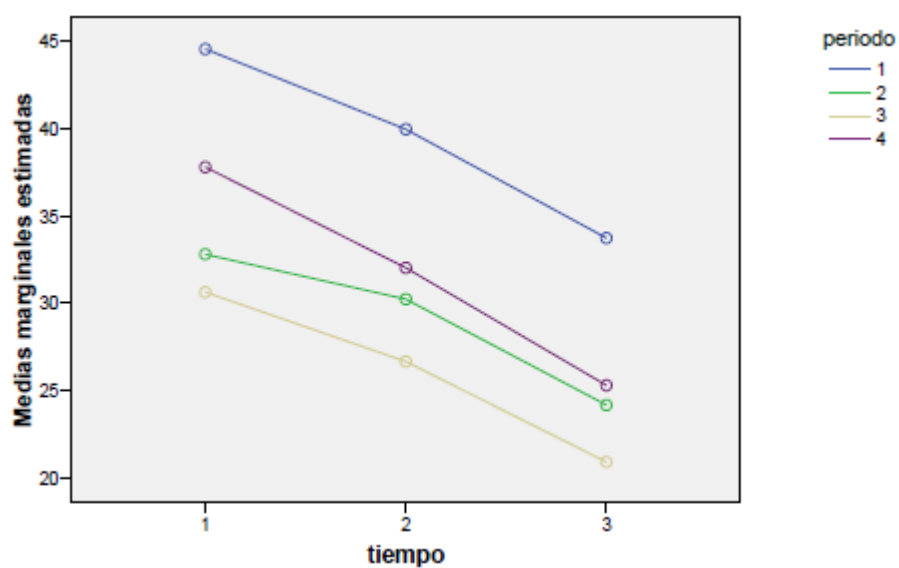


Gráfica E14

para el tratamiento 3

**Gráfica E15**

para el tratamiento 4



B. Fragmentación

Se han considerado los siguientes factores:

- el factor inter-sujetos: **Raza**, con 3 niveles: raza frisona (1), raza limusina (2), y raza rubia gallega (3).
- dos factores intra-sujetos:
 - * **Tratamiento**, con 4 niveles: sin tratamiento (1), dosis de 2 mg (2), dosis de 1 mg (3), y dosis de 0,5 mg (4).
 - * **Periodo**, con 4 niveles: del 7 al 21 de noviembre de 2011 (1), del 9 al 16 de enero de 2012 (2), del 30 de enero al 13 de febrero de 2012 (3), y del 12 al 26 de marzo de 2012 (4).

Para cada combinación **Tratamiento-Periodo** se dispone de un total de 36 mediciones, 12 para cada raza (4 toros por raza y 3 medidas para cada toro).

Se ha estudiado la variable **at** que determina la fragmentación de los espermatozoides, y con los datos obtenidos se han seleccionado las variables que representan el porcentaje de células al margen de la población principal, la media de todas las células analizadas y la desviación típica de todas las células analizadas. Por su naturaleza, el ANOVA se ha realizado únicamente para las dos primeras variables.

B1. Porcentaje de células al margen de la población principal (COMP)

En primer lugar se ha considerado la condición de **esfericidad** (igualdad de matrices de dispersión) para determinar si se dan las condiciones para utilizar la prueba F al contrastar los factores intra-sujetos.

Para ello se ha aplicado de nuevo el test de Mauchly, cuyos resultados se muestran en la **Tabla E12**. De acuerdo con la columna **Significación**, se rechaza la condición de esfericidad, pues el valor más alto es 0,004 ($<0,05$).

A continuación la **Tabla E13** recoge los resultados de las pruebas de los efectos intra-sujetos. De acuerdo con la columna **Significación** (omitiendo las filas de **Esfericidad asumida** por no cumplirse esta condición), se puede concluir que aparte las interacciones de los factores sólo es significativo el factor **Tratamiento** (el mayor nivel de significación obtenido para este factor es $0,024 < 0,05$, correspondiente al contraste Límite inferior). Los niveles de significación obtenidos al contrastar el efecto del factor **Periodo** son todos mayores que 0,10.

Tabla E12 Prueba de esfericidad de Mauchly^b

Efecto intra-sujetos	W de Mauchy	Chi-cuadrado	gl	Significación	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Periodo	,026	115,712	5	,000	,388	,418	,333
tratamiento	,578	17,377	5	,004	,763	,873	,333
periodo * tratamiento	,018	119,066	44	,000	,452	,555	,111

Contrasta la hipótesis nula de que la matriz de covarianza error de las variables dependientes transformadas es proporcional a una matriz identidad.

^a Puede usarse para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas. Las pruebas corregidas se muestran en la tabla Pruebas de los efectos inter-sujetos.

^b Diseño: Intersección+raza

Diseño intra sujetos: periodo+tratamiento+periodo*tratamiento

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	GI	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Periodo	Esfericidad asumida	498,897	3	166,299	2,079	,108	,059
	Greenhouse-Geisser	498,897	1,164	428,761	2,079	,155	,059
	Huynh-Feldt	498,897	1,253	398,184	2,079	,153	,059
	Límite-inferior	498,897	1,000	498,897	2,079	,159	,059
Periodo * raza	Esfericidad asumida	2516,568	6	419,428	5,243	,000	,241
	Greenhouse-Geisser	2516,568	2,327	1081,392	5,243	,007	,241
	Huynh-Feldt	2516,568	2,506	1004,273	5,243	,006	,241
	Límite-inferior	2516,568	2,000	1258,284	5,243	,011	,241
Error (periodo)	Esfericidad asumida	7919,097	99	79,991			
	Greenhouse-Geisser	7919,097	38,398	206,237			
	Huynh-Feldt	7919,097	41,347	191,529			
	Límite-inferior	7919,097	33,000	239,973			
Tratamiento	Esfericidad asumida	13,981	3	4,660	5,638	,001	,146
	Greenhouse-Geisser	13,981	2,290	6,104	5,638	,004	,146
	Huynh-Feldt	13,981	2,620	5,337	5,638	,002	,146
	Límite-inferior	13,981	1,000	13,981	5,638	,024	,146

Tratamiento * raza	Esfericidad asumida	11,518	6	1,920	2,323	,039	,123
	Greenhouse-Geisser	11,518	4,581	2,514	2,323	,056	,123
	Huynh-Feldt	11,518	5,240	2,198	2,323	,047	,123
	Límite-inferior	11,518	2,000	5,759	2,323	,114	,123
Error (tratamiento)	Esfericidad asumida	81,829	99	,827			
	Greenhouse-Geisser	81,829	75,582	1,083			
	Huynh-Feldt	81,829	86,453	,947			
	Límite-inferior	81,829	33,000	2,480			
Periodo * tratamiento	Esfericidad asumida	19,295	9	2,144	2,517	,009	,071
	Greenhouse-Geisser	19,295	4,069	4,742	2,517	,043	,071
	Huynh-Feldt	19,295	4,995	3,863	2,517	,032	,071
	Límite-inferior	19,295	1,000	19,295	2,517	,012	,071
Periodo * tratamiento * raza	Esfericidad asumida	44,949	18	2,497	2,931	,000	,151
	Greenhouse-Geisser	44,949	8,139	5,523	2,931	,005	,151
	Huynh-Feldt	44,949	9,989	4,500	2,931	,002	,151
	Límite-inferior	44,949	2,000	22,475	2,931	,067	,151
Error(Periodo * tratamiento)	Esfericidad asumida	253,001	297	,852			
	Greenhouse-Geisser	253,001	134,289	1,884			
	Huynh-Feldt	253,001	164,821	1,535			
	Límite-inferior	253,001	33,000	7,667			

La **Tabla E14** recoge los resultados de las pruebas de los efectos inter-sujetos debidos al factor **Raza**. Se puede concluir que las diferencias observadas en los resultados no se deben a este factor (significación $0,071 > 0,05$), sino a la interacción de los factores incluidos en el estudio.

Tabla E14 Pruebas de los efectos inter-sujetos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Intersección	29927,703	1	29927,703	53,422	,000	,618
raza	3206,656	2	1603,328	2,862	,071	,148
Error	18487,167	33	560,217			

La **Tabla E15** de estimaciones muestra las respuestas medias para cada una de las tres razas, junto con los correspondientes intervalos de confianza al 95%, que corroboran la conclusión anterior, observándose sin embargo un efecto mayor (sin llegar a ser estadísticamente significativo) para la segunda raza.

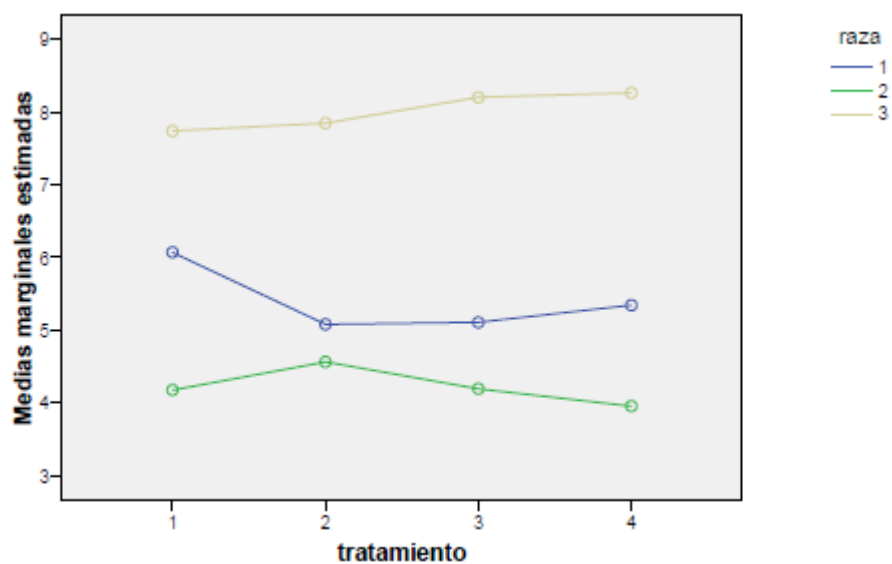
Tabla E15 Estimaciones

raza	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	5,036	1,708	1,561	8,512
2	10,488	1,708	7,013	13,963
3	6,100	1,708	2,625	9,575

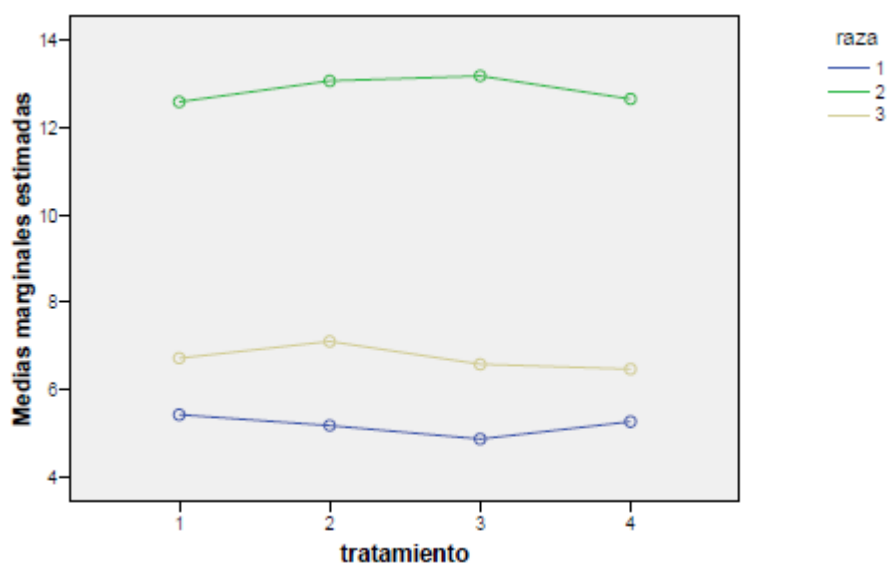
A continuación se presentan las **Gráficas E16, E17, E18 y E19** de perfil correspondientes a la combinación **Tratamiento*Raza*Periodo** que muestran el comportamiento de las distintas razas.

Gráfica E16

para el periodo 1

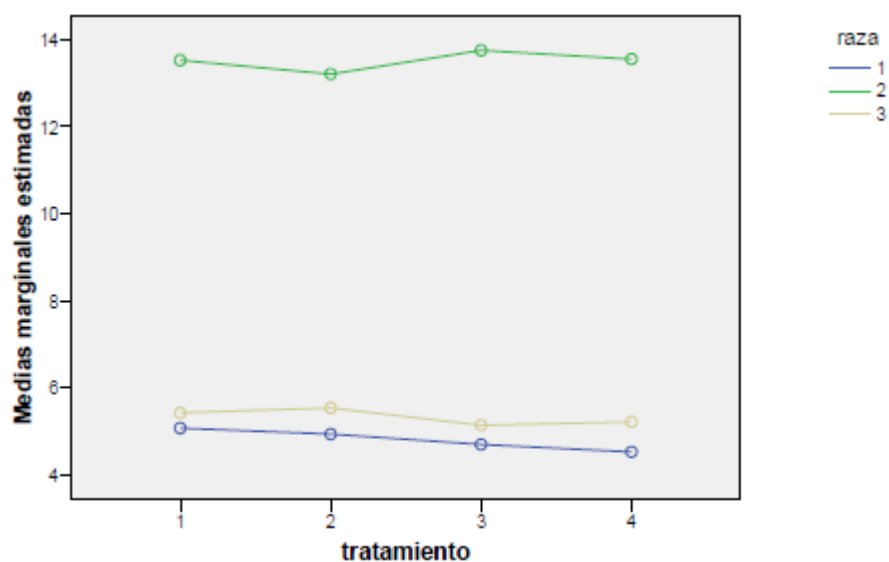
**Gráfica E17**

para el periodo 2

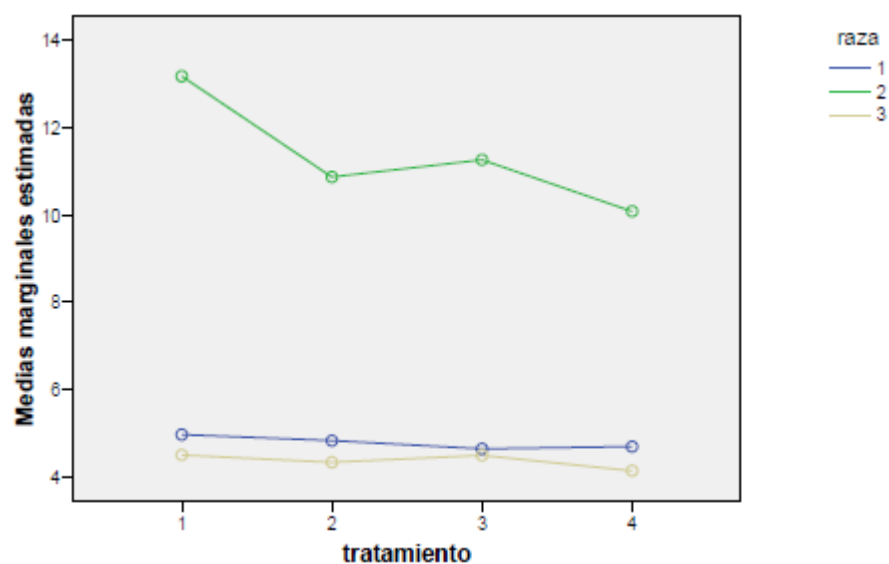


Gráfica E18

para el periodo 3

**Gráfica E19**

para el periodo 4



A continuación para los factores **Periodo** y **Tratamiento** se presentan las estimaciones de las respuestas medias (incluyendo intervalos de confianza al 95%), y de comparaciones por pares para el segundo factor.

1. Periodo

La **Tabla E16** ofrece los resultados de las estimaciones de medias e intervalos de confianza al 95% para este factor, de efectos no significativos en la variable analizada.

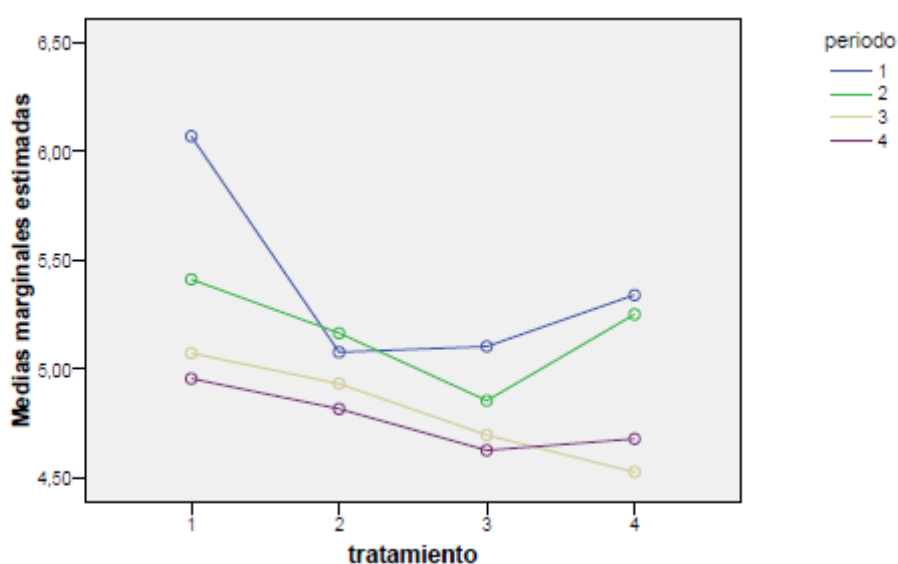
Tabla E16 Estimaciones

periodo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	5,876	,499	4,861	6,892
2	8,250	1,417	5,367	11,134
3	7,884	1,657	4,512	11,255
4	6,822	,743	5,311	8,334

Las **Gráficas E20, E21 y E22** de perfil correspondientes a la combinación **Tratamiento*Periodo*Raza** muestran el comportamiento en los distintos períodos para cada uno de los tratamientos utilizados.

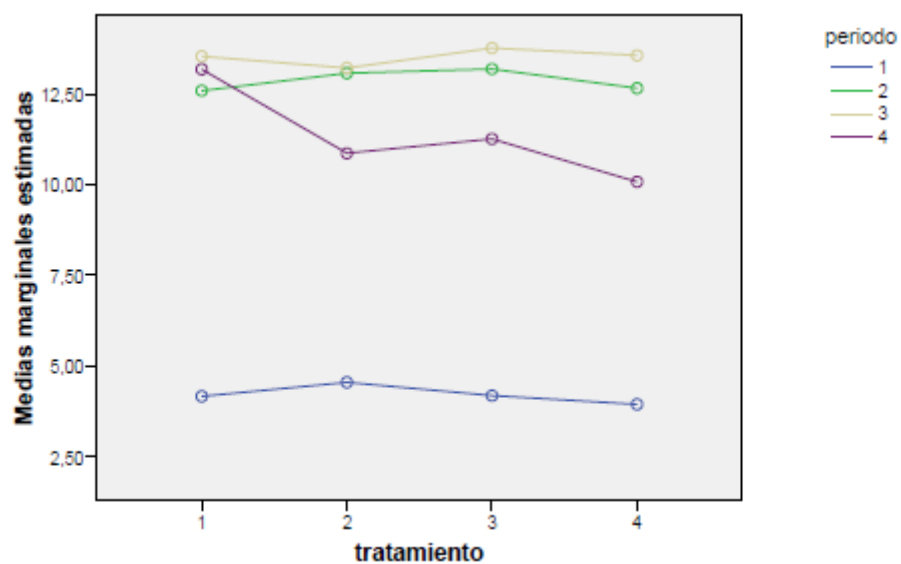
Gráfica E20

para la raza 1

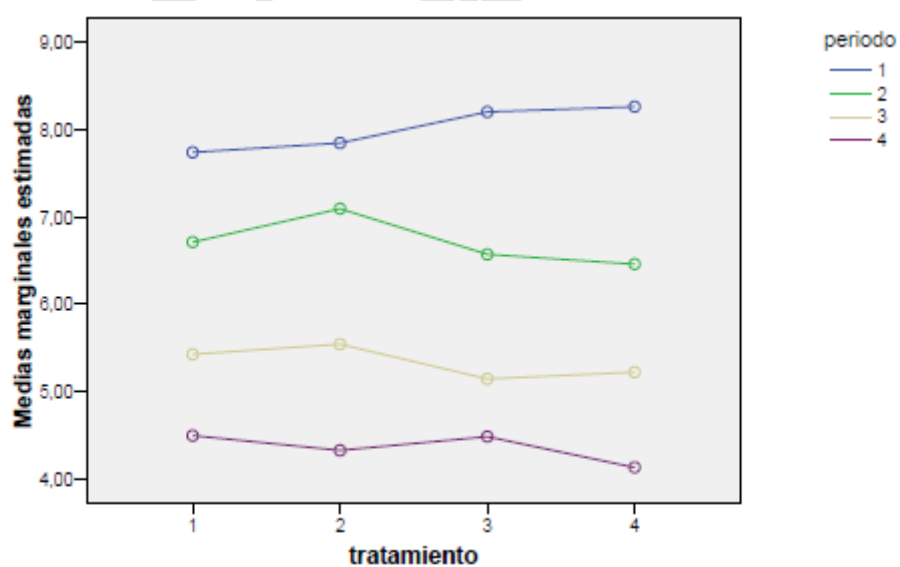


Gráfica E21

para la raza 2

**Gráfica E22**

para la raza 3



2. Tratamiento

Las **Tablas E 17 y E18** ofrecen los resultados para este factor, el único significativo, por lo que se presentan, además de las estimaciones para los efectos medios, los resultados de las comparaciones por pares.

Tabla E17 Estimaciones

tratamiento	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	7,445	,976	5,460	9,430
2	7,208	,990	5,193	9,222
3	7,172	,977	5,185	9,159
4	7,009	1,011	4,952	9,065

Tabla E18 Comparaciones por pares

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	,237	,125	,402	-,114	,588
	3	,273	,127	,232	-,083	,628
	4	,436*	,123	,007	,091	,781
2	1	-,237	,125	,402	-,588	,114
	3	,036	,091	1,000	-,219	,291
	4	,199*	,066	,029	,014	,384
3	1	-,273	,127	,232	-,628	,083
	2	-,036	,091	1,000	-,291	,219
	4	,163	,097	,614	-,110	,436
4	1	-,436*	,123	,007	-,781	-,091
	2	-,199*	,066	,029	-,384	-,014
	3	-,163	,097	,614	-,436	,110

Basadas en las medias marginales esperadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

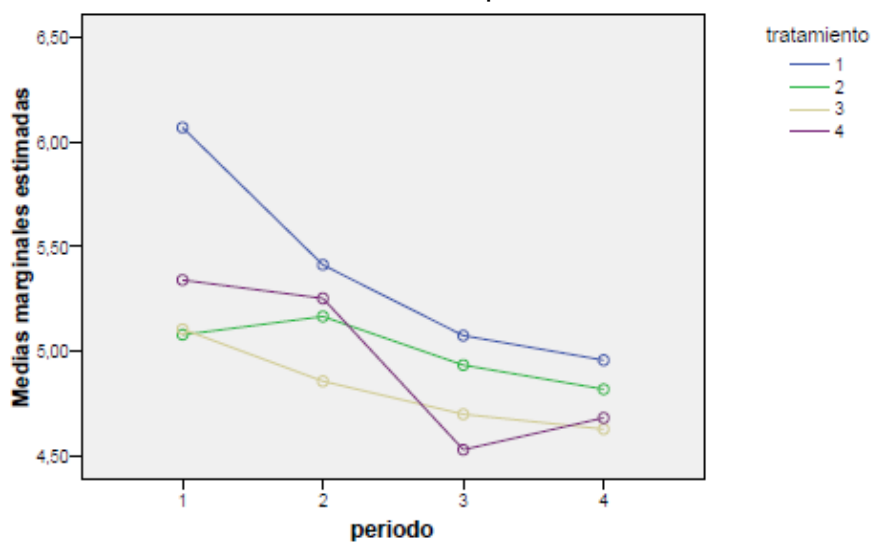
^a Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

Existen diferencias significativas entre el tratamiento 4 y los tratamientos 1 y 2.

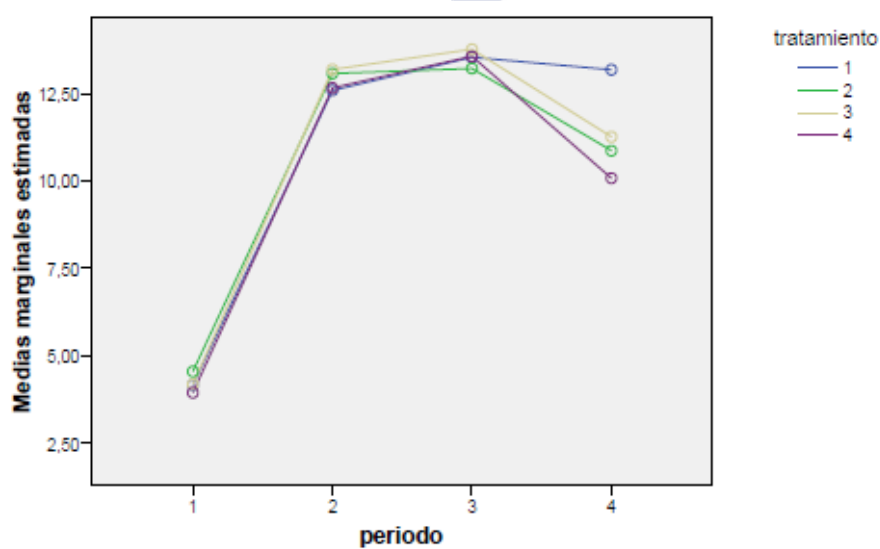
Las **Gráficas E23, E24 y E25** de perfil correspondientes a la combinación ***Periodo*Tratamiento*Raza** muestran el comportamiento de los distintos tratamientos para cada raza.

Gráfica E23

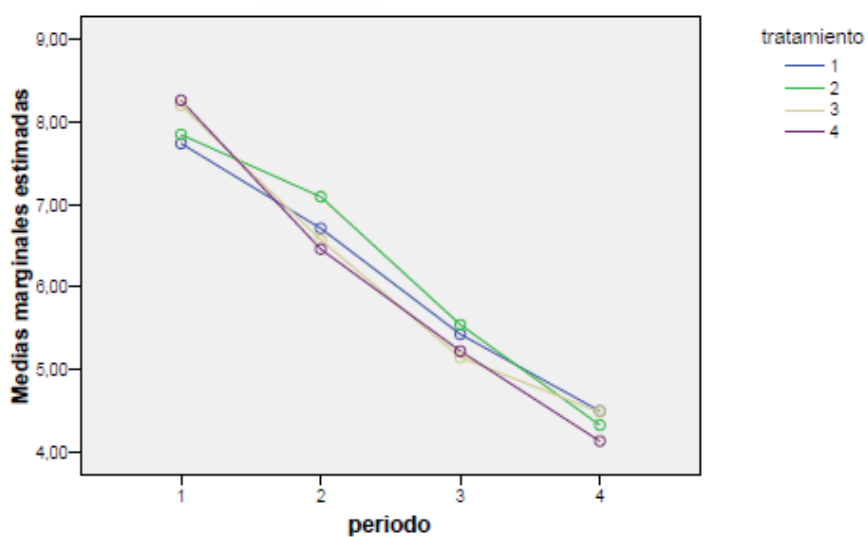
para la raza 1

**Gráfica E24**

para la raza 2

**Gráfica E25**

para la raza 3



B2. Media de todas las células analizadas

En primer lugar se ha considerado la condición de **esfericidad** (igualdad de matrices de dispersión) para determinar si se dan las condiciones para utilizar la prueba F al contrastar los factores intra-sujetos. Para ello se ha aplicado de nuevo el test de Mauchly, cuyos resultados se muestran en la **Tabla E19**.

De acuerdo con la columna **Significación**, se rechaza la condición de esfericidad para el factor **Tratamiento** pero no para el factor **Periodo**, que presenta una significación $0,186 > 0,05$.



Tabla E19 Prueba de esfericidad de Mauchly^b

Efecto intra-sujetos	W de Mauchy	Chi-cuadrado	gl	Significación	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Periodo	,789	7,498	5	,186	,874	1,000	,333
tratamiento	,494	22,395	5	,000	,681	,771	,333
periodo * tratamiento	,040	95,641	44	,000	,591	,760	,111

Contrasta la hipótesis nula de que la matriz de covarianza error de las variables dependientes transformadas es proporcional a una matriz identidad.

^a Puede usarse para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas. Las pruebas corregidas se muestran en la tabla Pruebas de los efectos inter-sujetos.

^b Diseño: Intersección+raza

Diseño intra sujetos: periodo+tratamiento+periodo*tratamiento

A continuación la **Tabla E20** recoge los resultados de las pruebas de los efectos intra-sujetos. De acuerdo con la columna **Significación** se puede concluir que existen diferencias significativas entre los niveles del factor **Periodo**. Por el contrario, el factor **Tratamiento** no es significativo (el menor nivel de significación es $0,444 > 0.05$, correspondiente al contraste del Límite inferior).

Tabla E20 Pruebas de efectos intra-sujetos

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	GI	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Periodo	Esfericidad asumida	68861,438	3	22953,813	26,222	,000	,443
	Greenhouse-Geisser	68861,438	2,623	26249,922	26,222	,000	,443
	Huynh-Feldt	68861,438	3,000	22953,813	26,222	,000	,443
	Límite-inferior	68861,438	1,000	68861,438	26,222	,000	,443
Periodo * raza	Esfericidad asumida	35195,258	6	5865,876	6,701	,000	,289
	Greenhouse-Geisser	35195,258	5,247	6708,202	6,701	,000	,289
	Huynh-Feldt	35195,258	6,000	5865,876	6,701	,000	,289
	Límite-inferior	35195,258	2,000	17597,629	6,701	,004	,289
Error (periodo)	Esfericidad asumida	86660,077	99	875,354			
	Greenhouse-Geisser	86660,077	86,569	1001,053			
	Huynh-Feldt	86660,077	99,000	875,354			
	Límite-inferior	86660,077	33,000	2626,063			
Tratamiento	Esfericidad asumida	101,844	3	33,948	,601	,616	,018
	Greenhouse-Geisser	101,844	2,044	49,825	,601	,555	,018
	Huynh-Feldt	101,844	2,312	44,041	,601	,574	,018
	Límite-inferior	101,844	1,000	101,844	,601	,444	,018
Tratamiento * raza	Esfericidad asumida	664,393	6	110,732	1,959	,079	,106
	Greenhouse-Geisser	664,393	4,088	162,520	1,959	,109	,106
	Huynh-Feldt	664,393	4,625	143,654	1,959	,100	,106
	Límite-inferior	664,393	2,000	332,197	1,959	,157	,106

Error (tratamiento)	Esfericidad asumida	5595,910	99	56,524			
	Greenhouse-Geisser	5595,910	67,453	82,960			
	Huynh-Feldt	5595,910	76,312	72,329			
	Límite-inferior	5595,910	33,000	169,573			
Periodo * tratamiento	Esfericidad asumida	1051,428	9	116,825	2,106	,029	,060
	Greenhouse-Geisser	1051,428	5,315	197,826	2,106	,063	,060
	Huynh-Feldt	1051,428	6,839	153,741	2,106	,045	,060
	Límite-inferior	1051,428	1,000	1051,428	2,106	,156	,060
Periodo * tratamiento * raza	Esfericidad asumida	2510,828	18	139,490	2,514	,001	,132
	Greenhouse-Geisser	2510,828	10,630	236,206	2,514	,006	,132
	Huynh-Feldt	2510,828	13,678	183,568	2,514	,003	,132
	Límite-inferior	2510,828	2,000	1255,414	2,514	,096	,132
Error(Periodo * tratamiento)	Esfericidad asumida	16476,482	297	55,476			
	Greenhouse-Geisser	16476,482	175,392	93,941			
	Huynh-Feldt	16476,482	225,685	73,006			
	Límite-inferior	16476,482	33,000	499,287			

La **Tabla E21** recoge los resultados de las pruebas de los efectos inter-sujetos debidos al factor **Raza**.

Se puede concluir que existen diferencias significativas en las respuestas medidas en las tres razas.

Tabla E21 Pruebas de los efectos inter-sujetos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Intersección raza	38289405,118	1	38289405,1	20363,991	,000	,998
Error	43695,097	2	21847,549	11,619	,000	,413
Error	62048,267	33	1880,251			

A continuación se presentan las **Tablas E22 y E23** de estimaciones y comparaciones por pares, que permiten apreciar que la mayor respuesta media se obtiene para los animales de la segunda raza, significativamente distinta de las medidas en las otras dos razas.

Salvo para el periodo 1, la respuesta de la raza 2 es claramente mayor que las de las otras dos razas.

Tabla E22 Estimaciones

			Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	252,536	3,129	246,169	258,903
2	270,105	3,129	263,738	276,472
3	250,839	3,129	244,472	257,206

Tabla E23 Comparaciones por pares

(I) raza	(J) raza	Diferencia entre medias (I-J)			Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-17,569*	4,426	,001	-28,731	-6,407
	3	1,697	4,426	1,000	-9,465	12,859
2	1	17,569*	4,426	,001	6,407	28,731
	3	19,266*	4,426	,000	8,104	30,428
3	1	-1,697	4,426	1,000	-12,859	9,465
	2	-19,266*	4,426	,000	-30,428	-8,104

Basadas en las medias marginales esperadas.

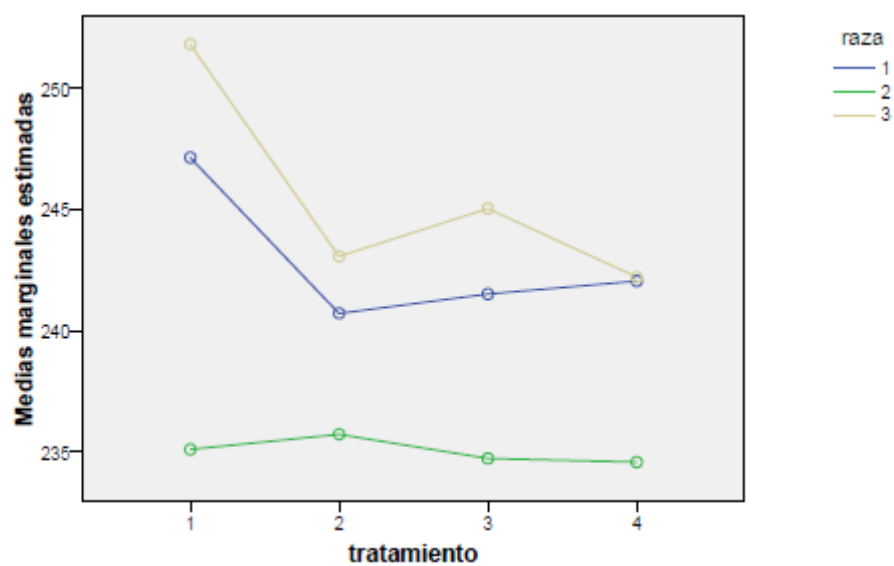
* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

^a Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

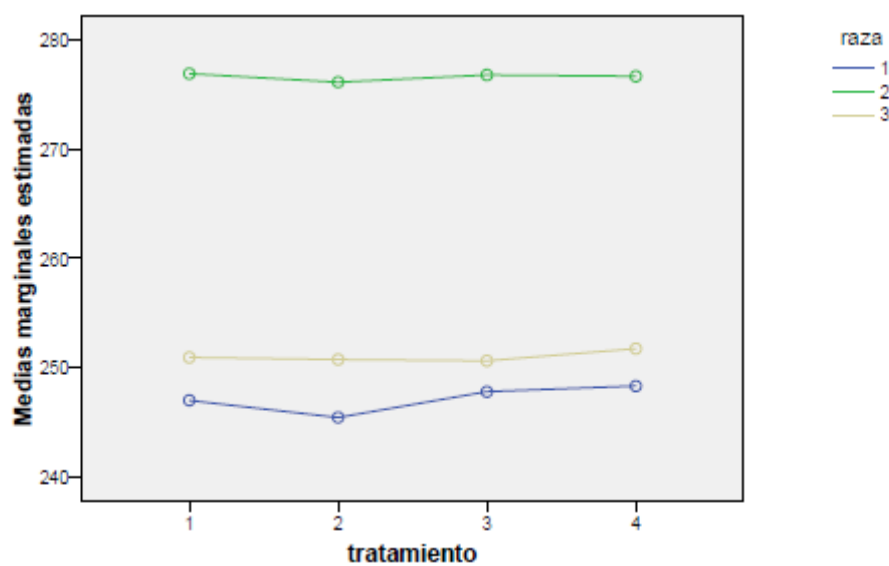
Las **Gráficas E26, E27, E28 y E29** de perfil correspondientes a la combinación ***Tratamiento*Raza*Periodo** muestran los comportamientos observados de las distintas razas.

Gráfica E26

para el periodo 1

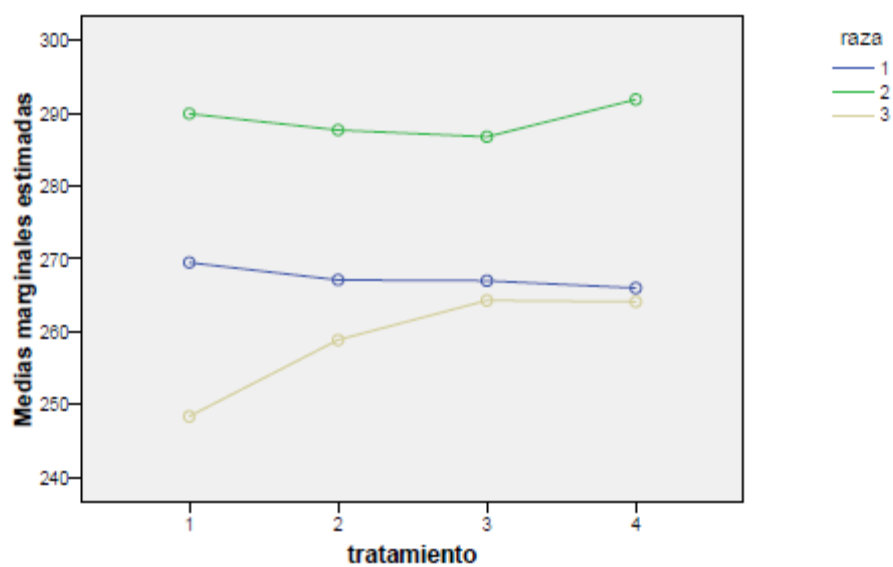
**Gráfica E27**

para el periodo 2

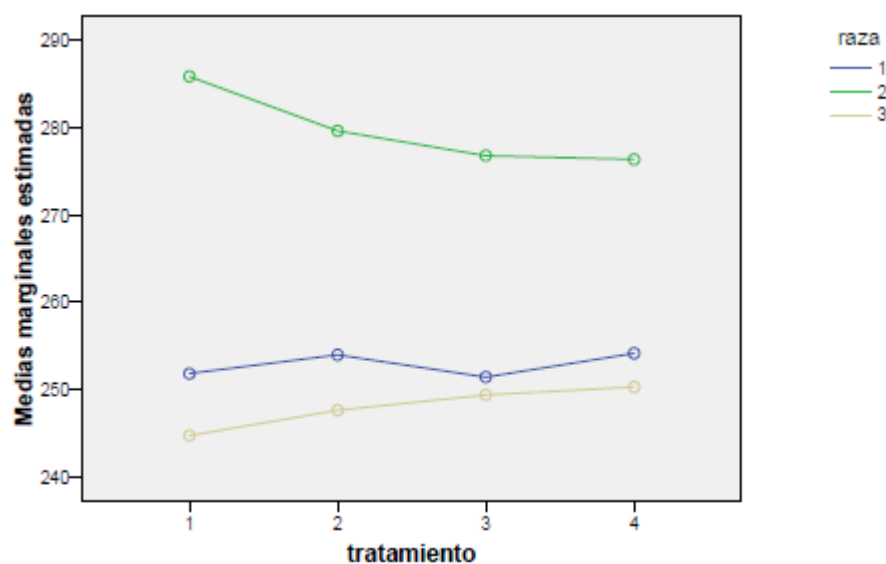


Gráfica E28

para el periodo 3

**Gráfica E29**

para el periodo 4



A continuación para los factores **Periodo** y **Tratamiento** se presentan las estimaciones de las respuestas medias (incluyendo intervalos de confianza al 95%), y comparaciones por pares.

1. Periodo

Las **Tablas E24 y E25** ofrecen las estimaciones para los efectos medios y los resultados de las comparaciones por pares para este factor.

Tabla E24 Estimaciones

periodo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	241,151	2,436	236,195	246,106
2	258,246	3,429	251,270	265,222
3	271,777	2,783	266,115	277,440
4	260,133	2,420	255,210	265,057

Tabla E25 Comparaciones por pares

(I) periodo	(J) periodo	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-17,096*	3,807	,000	-27,782	-6,409
	3	-30,627*	2,593	,000	-37,904	-23,349
	4	-18,983*	3,561	,000	-28,979	-8,986
2	1	17,096*	3,807	,000	6,409	27,782
	3	-13,531*	3,850	,008	-24,338	-2,724
	4	-1,887	3,509	1,000	-11,737	7,963
3	1	30,627*	2,593	,000	23,349	37,904
	2	13,531*	3,850	,008	2,724	24,338
	4	11,644*	3,450	,011	1,961	21,327
4	1	18,983*	3,561	,000	8,986	28,979
	2	1,887	3,509	1,000	-7,963	11,737
	3	-11,644*	3,450	,011	-21,327	-1,961

Basadas en las medias marginales esperadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

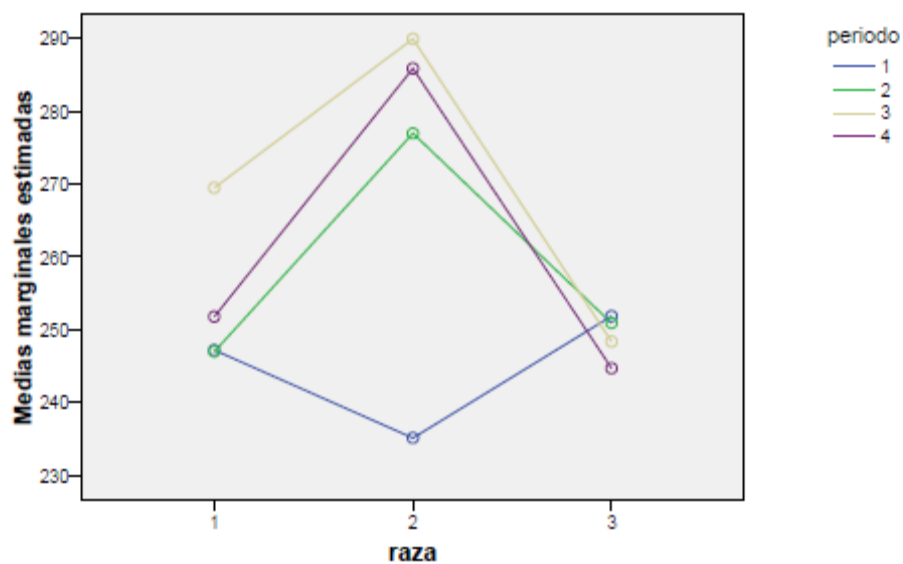
^a Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

El análisis revela que existen diferencias significativas entre los periodos. La diferencia entre los periodos 2 y 4 no es significativa, pero estos dos periodos sí resultan significativamente distintos de los periodos 1 y 3, que producen las respuestas medias extremas, menor y mayor respectivamente.

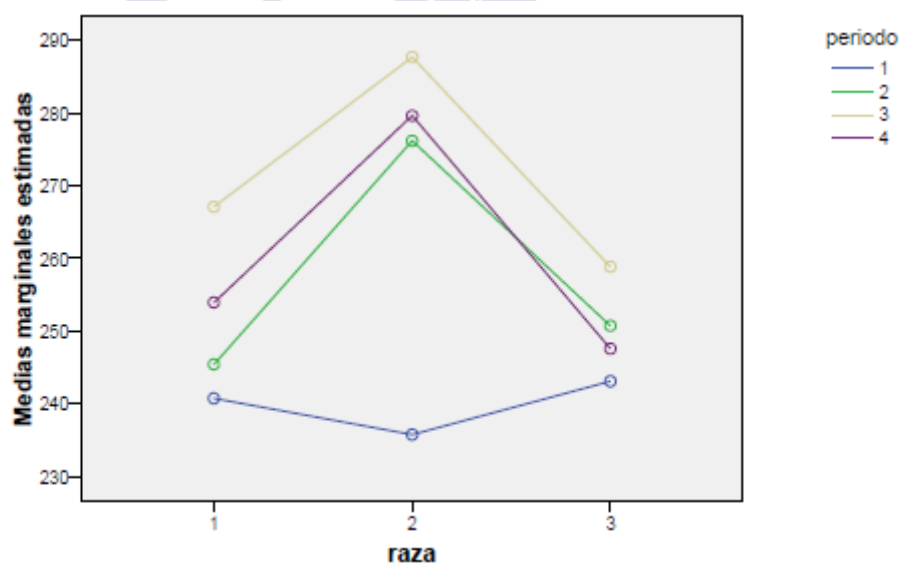
Las **Gráficas E30, E31, E32 y E33** de perfil correspondientes a la combinación **Raza*Periodo*Tratamiento** muestran los comportamientos observados para los distintos periodos.

Gráfica E30

para el tratamiento 1

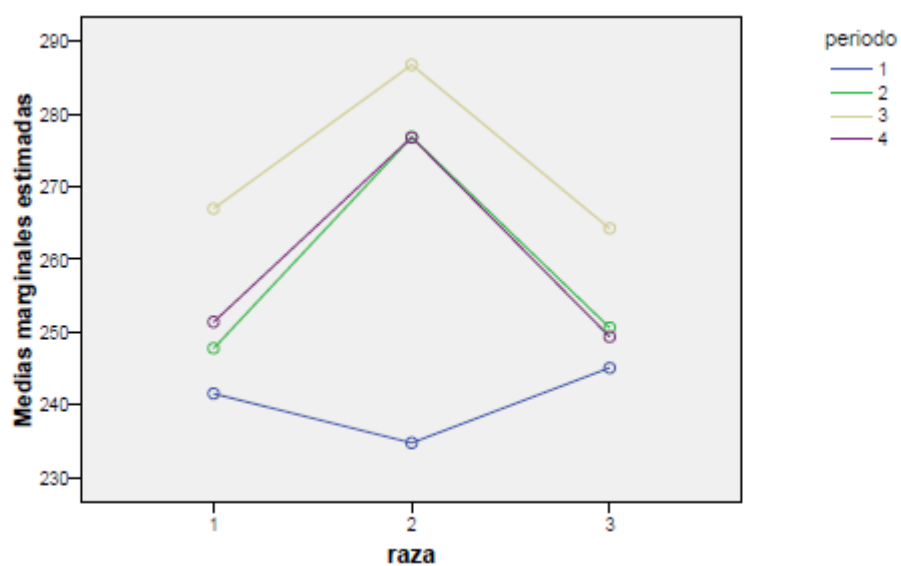
**Gráfica E31**

para el tratamiento 2

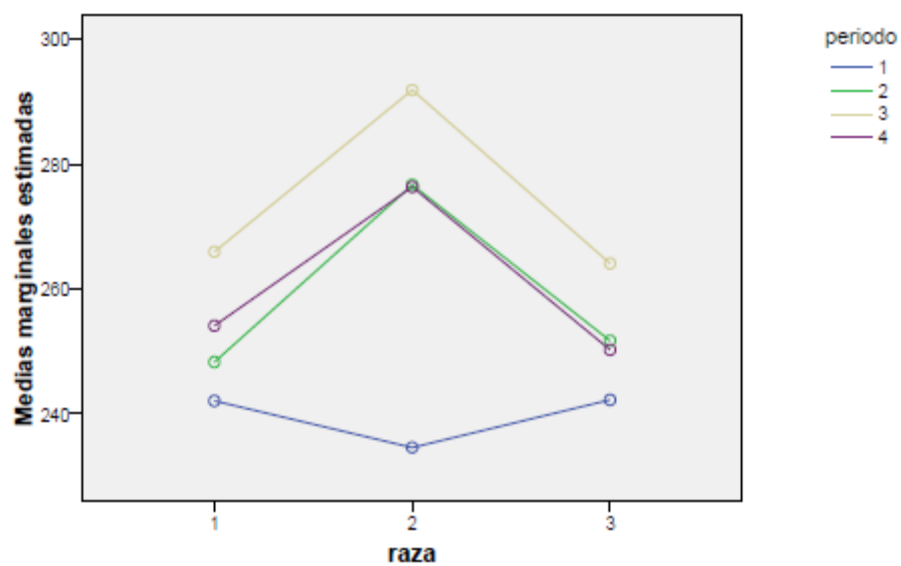


Gráfica E32

para el tratamiento 3

**Gráfica E33**

para el tratamiento 4



2. Tratamiento

Las **Tablas E26 y E27** ofrecen las estimaciones para los efectos medios y los resultados de las comparaciones por pares para este factor.

Tabla E26 Estimaciones

tratamiento	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	258,247	1,844	254,496	261,998
2	257,212	1,917	253,312	261,112
3	257,665	1,949	253,699	261,631
4	258,183	1,833	254,453	261,912

Tabla E27 Comparaciones por pares

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	1,035	,982	1,000	-1,722	3,792
	3	,582	1,107	1,000	-2,525	3,688
	4	,065	1,119	1,000	-3,077	3,206
2	1	-1,035	,982	1,000	-3,792	1,722
	3	-,453	,571	1,000	-2,056	1,149
	4	-,971	,658	,897	-2,816	,875
3	1	-,582	1,107	1,000	-3,688	2,525
	2	,453	,571	1,000	-1,149	2,056
	4	-,517	,714	1,000	-2,520	1,486
4	1	-,065	1,119	1,000	-3,206	3,077
	2	,971	,658	,897	-,875	2,816
	3	,517	,714	1,000	-1,486	2,520

Basadas en las medias marginales esperadas.

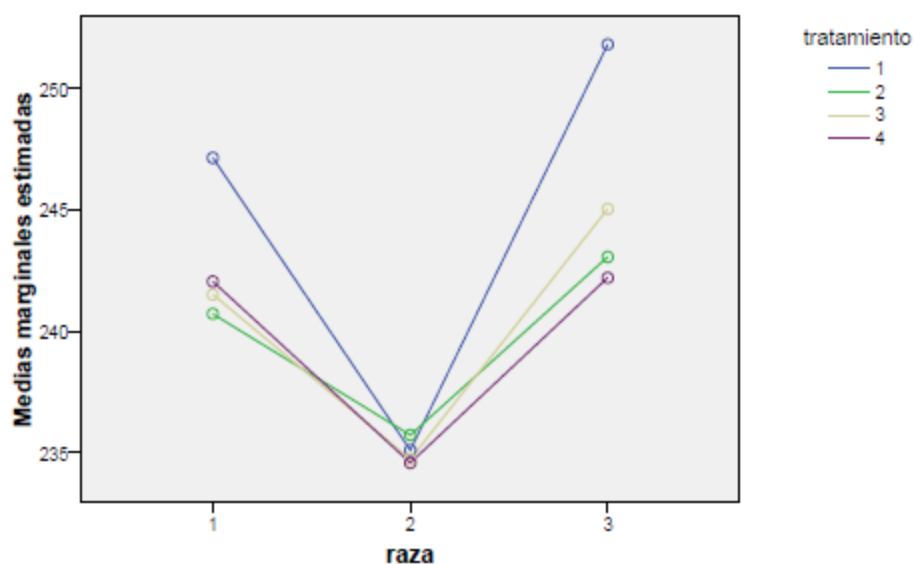
^a Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

No existen diferencias significativas entre las respuestas medias de los tratamientos.

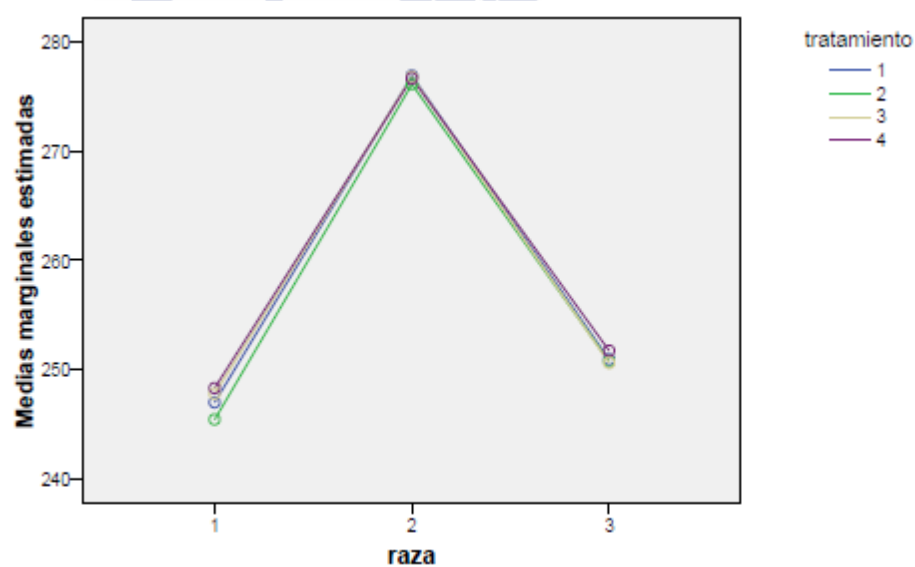
Las **Gráficas E34, E35, E36 y E37** de perfil correspondientes a la combinación **Raza*Tratamiento*Periodo** ilustran estos resultados.

Gráfica E34

para el periodo 1

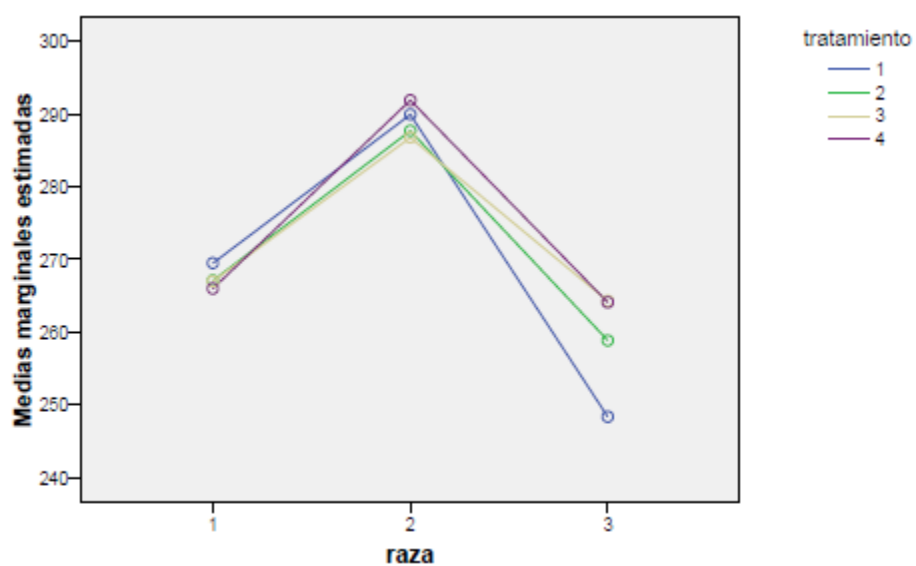
**Gráfica E35**

para el periodo 2

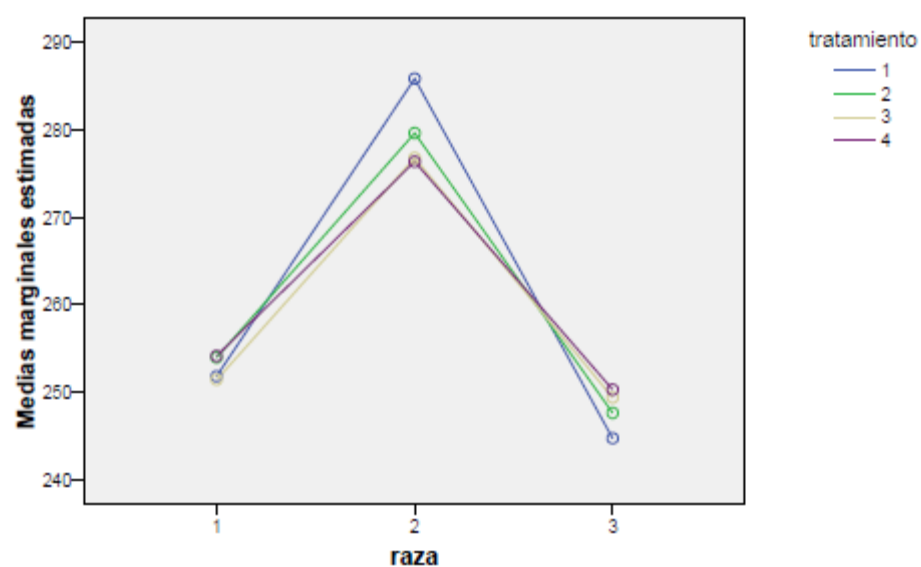


Gráfica E36

para el periodo 3

**Gráfica E37**

para el periodo 4



C. ACROSOMA

Se han considerado los siguientes factores:

- el factor inter-sujetos: **Raza**, con 3 niveles: raza frisona (1), raza limusina (2), y raza rubia gallega (3).

- dos factores intra-sujetos:

* **Periodo**, con 4 niveles: del 7 al 21 de noviembre de 2011 (1), del 9 al 16 de enero de 2012 (2), del 30 de enero al 13 de febrero de 2012 (3), y del 12 al 26 de marzo de 2012 (3).

* **Tratamiento**, con 8 niveles: los 4 niveles conocidos (sin tratamiento o control y tres dosis), **sin** y **con** inducción). Así: control sin inducción (1), control con inducción (2), dosis de 2 mg sin inducción (3), dosis de 2 mg con inducción (4), dosis de 1 mg sin inducción (5), dosis de 2 mg con inducción (6), dosis de 0,5 mg sin inducción (7), dosis de 0,5 mg con inducción (8).

Para cada combinación **Periodo-Tratamiento** se dispone de un total de 36 mediciones, 12 para cada raza (4 toros por raza y 3 medidas para cada toro).

Para cada una de las variables estudiadas, F (% espermatozoides vivos Areactivo), G (% espermatozoides muertos Areactivo), H (%espermatozoides vivos Aintegro) e I (% espermatozoides muertos Aintegro), se ha llevado a cabo el correspondiente ANOVA con medidas repetidas.

C1. Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reactivo

En primer lugar se ha considerado la condición de **esfericidad** (igualdad de matrices de dispersión) para determinar si se dan las condiciones para utilizar la prueba F al contrastar los factores intra-sujetos.

Para ello se ha aplicado de nuevo el test de Mauchly, cuyos resultados se muestran en la **Tabla E28**. De acuerdo con la columna **Significación**, se rechaza la condición de esfericidad, pues el valor más alto es $0,000 < 0,05$.

A continuación la **Tabla E29** recoge los resultados de las pruebas de los efectos intra-sujetos. De acuerdo con la columna **Significación** (omitendo las filas de **Esfericidad asumida** por no cumplirse esta condición), se puede concluir que son significativos los dos factores **Tratamiento** (el mayor nivel de significación obtenido para este factor $0,000 < 0,05$) y **Periodo** (el mayor nivel de significación obtenido para este factor $0,003 < 0,05$, correspondiente al test Límite inferior). Sin embargo, la única interacción claramente significativa es **Periodo-Tratamiento**.

Tabla E28 Prueba de esfericidad de Mauchly^b

Efecto intra-sujetos	W de Mauchy	Chi-cuadrado	gl	Significación	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Periodo	,296	38,623	5	,000	,607	,680	,333
tratamiento	,000	473,048	27	,000	,264	,295	,143
periodo * tratamiento	,000	1403,52	230	,000	,186	,227	,048

Contrasta la hipótesis nula de que la matriz de covarianza error de las variables dependientes transformadas es proporcional a una matriz identidad.

^a Puede usarse para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas. Las pruebas corregidas se muestran en la tabla Pruebas de los efectos inter-sujetos.

^b Diseño: Intersección+raza

Diseño intra sujetos: periodo+tratamiento+periodo*tratamiento

Tabla E29 Pruebas de efectos intra-sujetos

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	GI	Media cuadrática	F	Significación
Periodo	Esfericidad asumida	2186,212	3	728,737	10,702	,000
	Greenhouse-Geisser	2186,212	1,822	1199,714	10,702	,000
	Huynh-Feldt	2186,212	2,040	1071,682	10,702	,000
	Límite-inferior	2186,212	1,000	2186,212	10,702	,003
Periodo * raza	Esfericidad asumida	852,118	6	142,020	2,086	,062
	Greenhouse-Geisser	852,118	3,645	233,806	2,086	,100
	Huynh-Feldt	852,118	4,080	208,854	2,086	,091
	Límite-inferior	852,118	2,000	426,059	2,086	,140
Error (periodo)	Esfericidad asumida	6741,339	99	68,094		
	Greenhouse-Geisser	6741,339	60,135	112,103		
	Huynh-Feldt	6741,339	67,319	100,140		
	Límite-inferior	6741,339	33,000	204,283		
Tratamiento	Esfericidad asumida	168883,995	7	24126,285	558,167	,000
	Greenhouse-Geisser	168883,995	1,845	91531,458	558,167	,000
	Huynh-Feldt	168883,995	2,068	81671,743	558,167	,000
	Límite-inferior	168883,995	1,000	168883,995	558,167	,000
Tratamiento * raza	Esfericidad asumida	1696,497	14	121,178	2,803	,001
	Greenhouse-Geisser	1696,497	3,690	459,732	2,803	,037
	Huynh-Feldt	1696,497	4,136	410,210	2,803	,031
	Límite-inferior	1696,497	2,000	848,248	2,803	,075

Error (tratamiento)	Esfericidad asumida	9984,774	231	43,224		
	Greenhouse-Geisser	9984,774	60,888	163,986		
	Huynh-Feldt	9984,774	68,239	146,321		
	Límite-inferior	9984,774	33,000	302,569		
Periodo * tratamiento	Esfericidad asumida	1874,190	21	89,247	5,881	,000
	Greenhouse-Geisser	1874,190	3,905	480,007	5,881	,000
	Huynh-Feldt	1874,190	4,762	393,545	5,881	,000
	Límite-inferior	1874,190	1,000	1874,190	5,881	,021
Periodo * tratamiento * raza	Esfericidad asumida	984,933	42	23,451	1,545	,017
	Greenhouse-Geisser	984,933	7,809	126,128	1,545	,150
	Huynh-Feldt	984,933	9,525	103,409	1,545	,132
	Límite-inferior	984,933	2,000	492,466	1,545	,228
Error(Periodo * tratamiento)	Esfericidad asumida	10516,381	693	15,175		
	Greenhouse-Geisser	10516,381	128,849	81,618		
	Huynh-Feldt	10516,381	157,157	66,917		
	Límite-inferior	10516,381	33,000	318,678		

La **Tabla E30** recoge los resultados de las pruebas de los efectos inter-sujetos debidos al factor **Raza**. Se puede concluir que las diferencias observadas no se deben al cambio de raza (significación $0,980 > 0,05$), sino a la interacción de los factores incluidos en el estudio.

Tabla E30 Pruebas de los efectos inter-sujetos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	204585,123	1	204585,123	618,894	,000
raza	647,671	2	323,835	,980	,386
Error	10908,663	33	330,566		

La **Tabla E31** de estimaciones muestra las respuestas medias para cada raza, junto con los intervalos de confianza al 95% que corroboran la conclusión anterior.

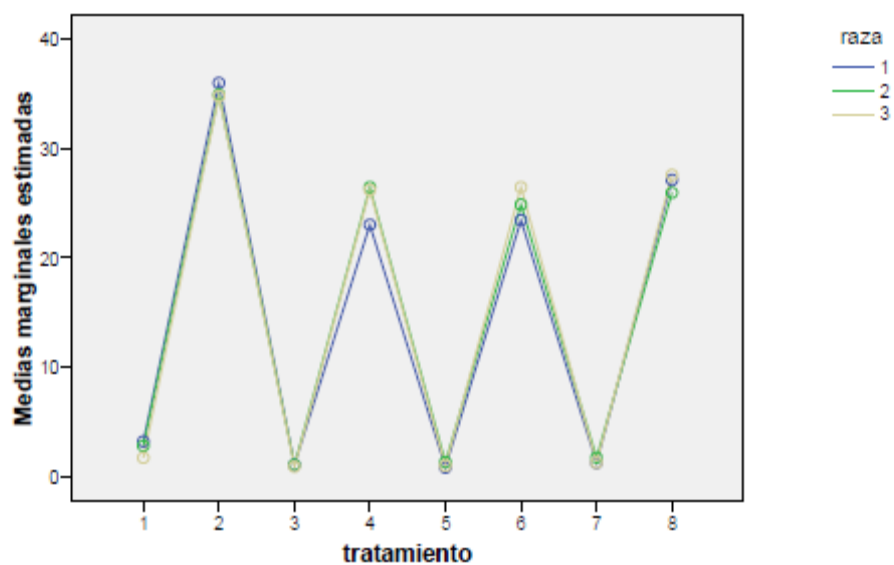
Tabla E31 Estimaciones

raza	Media	Error típ	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	14,072	,928	12,184	15,959
2	12,300	,928	10,413	14,188
3	13,607	,928	11,719	15,495

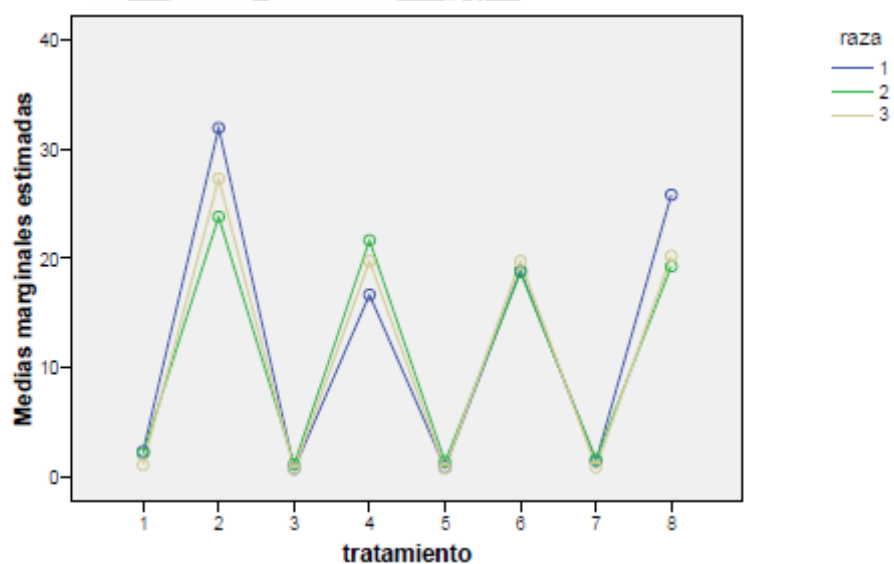
Las **Gráficas E38, E39, E40 y E41** de perfil correspondientes a la combinación ***Tratamiento*Raza*Periodo** muestran el comportamiento de las distintas razas.

Gráfica E38

para el periodo 1

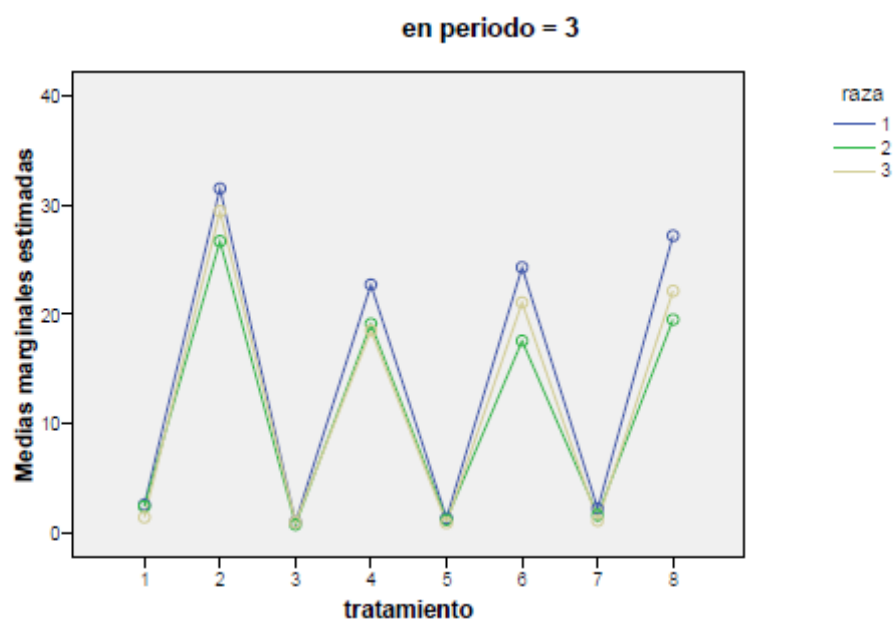
**Gráfica E39**

para el periodo 2

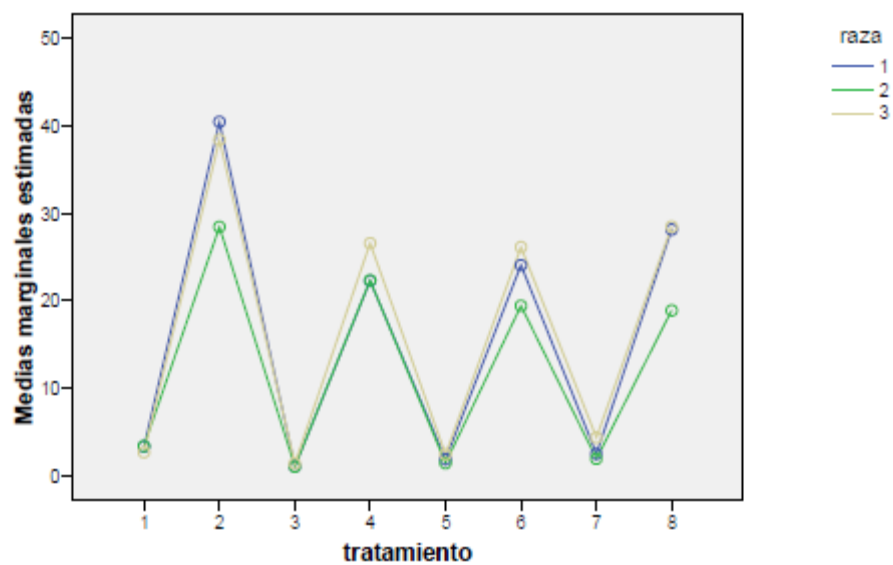


Gráfica E40

para el periodo 3

**Gráfica E41**

para el periodo 4



A continuación para los factores **Tratamiento** y **Periodo** se presentan las estimaciones de las respuestas medias y comparaciones por pares.

1. Tratamiento

Las **Tablas E32 y E33** ofrecen los resultados de las estimaciones de medias e intervalos de confianza al 95% y las comparaciones por pares.

Tabla E32 Estimaciones

tratamiento	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	2,372	,211	1,942	2,801
2	31,983	1,192	29,558	34,408
3	,932	,050	,830	1,034
4	22,098	1,017	20,029	24,168
5	1,221	,097	1,023	1,418
6	22,049	,880	20,258	23,839
7	1,769	,175	1,414	2,125
8	24,187	1,039	22,073	26,302

Tabla E33 Comparaciones por pares

(I)	(J)	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite sup
1	2	-29,612*	1,010	,000	-31,666	-27,557
	3	1,440*	,177	,000	1,079	1,801
	4	-19,727*	,894	,000	-21,546	-17,908
	5	1,151*	,135	,000	,877	1,425
	6	-19,677*	,729	,000	-21,159	-18,195
	7	,602*	,128	,000	,343	,862
	8	-21,816*	,868	,000	-23,582	-20,049
	1	29,612*	1,010	,000	27,557	31,666
2	3	31,051*	1,157	,000	28,698	33,404
	4	9,885*	,871	,000	8,114	11,656
	5	30,763*	1,111	,000	28,502	33,023
	6	9,934*	,769	,000	8,371	11,498
	7	30,214*	1,059	,000	28,059	32,368
	8	7,796*	,609	,000	6,556	9,036
	1	-1,440*	,177	,000	-1,801	-1,079
	2	-31,051*	1,157	,000	-33,404	-28,698
3	4	-21,167*	,987	,000	-23,174	-19,159
	5	-,289*	,064	,000	-,418	-,159
	6	-21,117*	,845	,000	-22,836	-19,397
	7	-,838*	,137	,000	-1,117	-,558
	8	-23,255*	1,008	,000	-25,306	-21,204
	1	19,727*	,894	,000	17,908	21,546
	2	-9,885*	,871	,000	-11,656	-8,114
	3	21,167*	,987	,000	19,159	23,174
4	5	20,878*	,948	,000	18,948	22,808
	6	,050	,444	,912	-,854	,953
	7	20,329*	,910	,000	18,477	22,181
	8	-2,089*	,652	,003	-3,416	-,761
	1	-1,151*	,135	,000	-1,425	-,877
	2	-30,763*	1,111	,000	-33,023	-28,502
	3	,289*	,064	,000	,159	,418
	4	-20,878*	,948	,000	-22,808	-18,948
5	6	-20,828*	,796	,000	-22,448	-19,208
	7	-,549*	,090	,000	-,732	-,366
	8	-22,967*	,954	,000	-24,907	-21,026
	1	19,677*	,729	,000	18,195	21,159
	2	-9,934*	,769	,000	-11,498	-8,371
	3	21,117*	,845	,000	19,397	22,836
	4	-,050	,444	,912	-,953	,854
	5	20,828*	,796	,000	19,208	22,448
6	7	20,279*	,752	,000	18,750	21,808
	8	-2,138*	,465	,000	-3,085	-1,192
	1	-,602*	,128	,000	-,862	-,343
	2	-30,214*	1,059	,000	-32,368	-28,059
	3	,838*	,137	,000	,558	1,117
	4	-20,329*	,910	,000	-22,181	-18,477
	5	,549*	,090	,000	,366	,732
	6	-20,279*	,752	,000	-21,808	-18,750
7	8	-22,418*	,903	,000	-24,255	-20,580
	1	21,816*	,868	,000	20,049	23,582
	2	-7,796*	,609	,000	-9,036	-6,556
	3	23,255*	1,008	,000	21,204	25,306
	4	2,089*	,652	,003	,761	3,416
	5	22,967*	,954	,000	21,026	24,907
	6	2,138*	,465	,000	1,192	3,085
	7	22,418*	,903	,000	20,580	24,255

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

^a Ajuste para comparaciones múltiples: diferencia menos significativa (equivalente a la ausencia de ajuste).

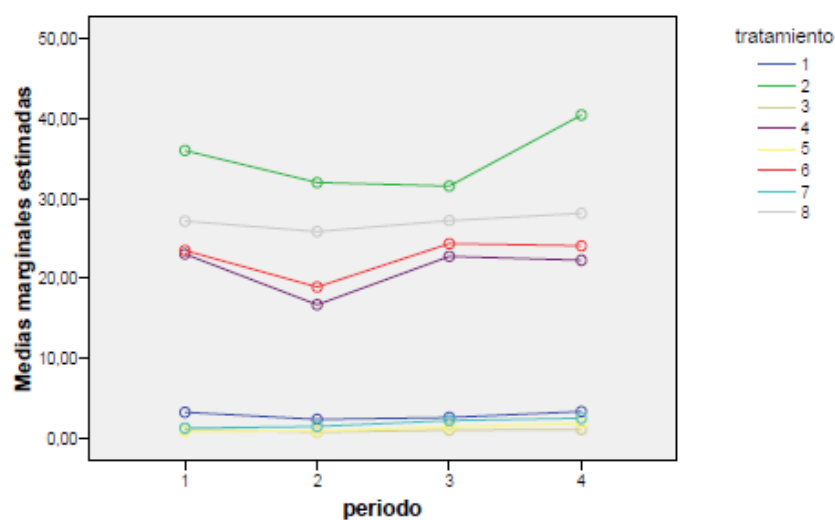
De la información aportada en las tablas de estimaciones y de comparaciones por pares puede concluirse que existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos con excepción de los tratamientos 4 y 6.

Las **Gráficas E42, E43 y E44** de perfil correspondientes a la combinación ***Periodo*Tratamiento*Raza** muestran el comportamiento de los tratamientos.

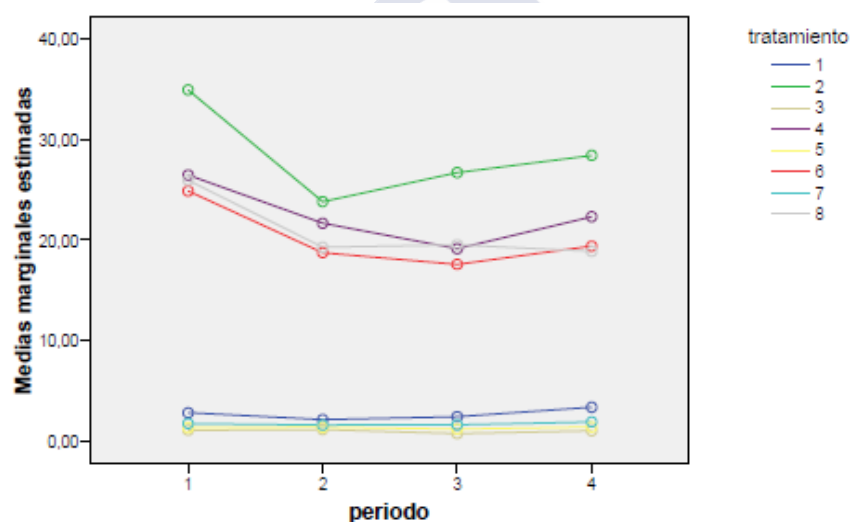


Gráfica E42

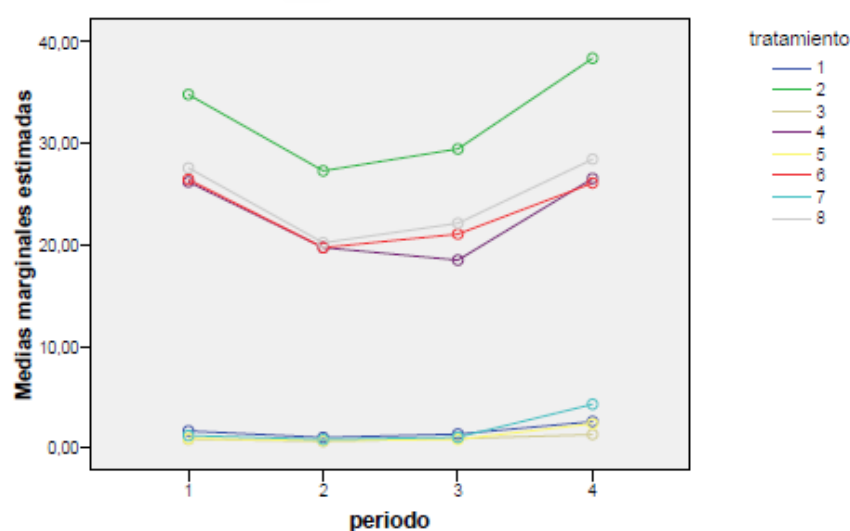
para la raza 1

**Gráfica E43**

para la raza 2

**Gráfica E44**

para la raza 3



2. Periodo

Las **Tablas E34 y E35** ofrecen los resultados de las estimaciones de medias e intervalos de confianza al 95% y las comparaciones por pares.

Tabla E34 Estimaciones

periodo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	14,773	,475	13,807	15,739
2	11,592	,554	10,465	12,720
3	12,363	,754	10,828	13,898
4	14,577	,869	12,809	16,345

Tabla E35 Comparaciones por pares

(I) periodo	(J) periodo	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	3,181*	,436	,000	2,294	4,067
	3	2,410*	,768	,004	,848	3,971
	4	,196	,882	,826	-1,599	1,991
2	1	-3,181*	,436	,000	-4,067	-2,294
	3	-,771	,562	,179	-1,914	,372
	4	-2,985*	,812	,001	-4,637	-1,332
3	1	-2,410*	,768	,004	-3,971	-,848
	2	,771	,562	,179	-,372	1,914
	4	-2,214*	,552	,000	-3,336	-1,091
4	1	-,196	,882	,826	-1,991	1,599
	2	2,985*	,812	,001	1,332	4,637
	3	2,214*	,552	,000	1,091	3,336

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

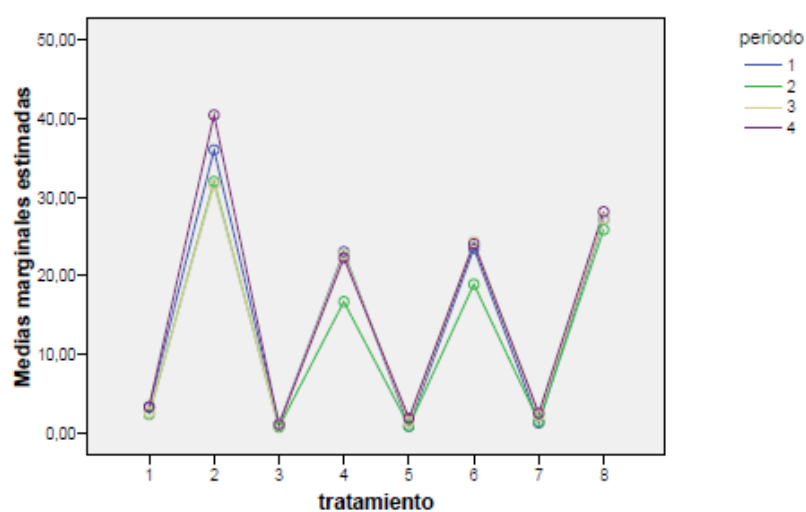
^a Ajuste para comparaciones múltiples: diferencia menos significativa (equivalente a la ausencia de ajuste).

Existen diferencias significativas entre las respuestas medidas en los periodos 1 y 4 y en los periodos 2 y 3.

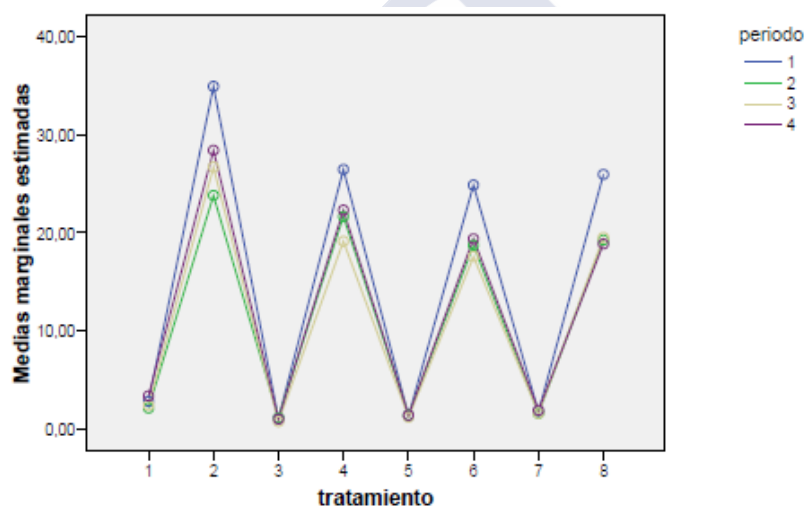
Las **Gráficas E45, E46 y E47** de perfil correspondientes a la combinación ***Tratamiento*Periodo*Raza** muestran el diferente comportamiento de los periodos 1 y 4 con respecto a los otros 2, siendo más apreciable la diferencia en la raza 3.

Grafica E45

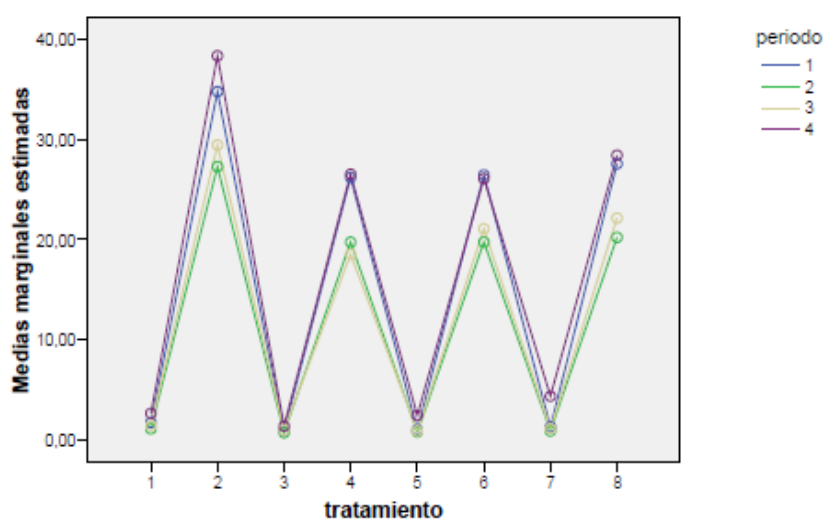
para la raza 1

**Grafica E46**

para la raza 2

**Grafica E47**

para la raza 3



C2. Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reactivo

En primer lugar se ha considerado la condición de **esfericidad** (igualdad de matrices de dispersión) para determinar si se dan las condiciones para utilizar la prueba F al contrastar los factores intra-sujetos. Para ello se ha aplicado de nuevo el test de Mauchly, cuyos resultados se muestran en la **Tabla E36**.

De acuerdo con la columna **Significación**, se rechaza la condición de esfericidad, pues el valor más alto es $0,001 < 0,05$.

La **Tabla E37** recoge los resultados de las pruebas de los efectos intra-sujetos. De acuerdo con la columna **Significación** (omitiendo las filas de **Esfericidad asumida** por no cumplirse esta condición), se puede concluir que son significativos los factores **Tratamiento** y **Periodo** (el mayor nivel de significación obtenido para estos factores $0,000 < 0,05$).

Todas las interacciones son significativas, excepto **Tratamiento*Raza** (los niveles de significación son mayores que 0,05).

Tabla E36 Prueba de esfericidad de Mauchly^b

Efecto intra-sujetos	W de Mauchy	Chi-cuadrado	gl	Significación	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Periodo	,517	20,907	5	,001	,770	,881	,333
tratamiento	,000	238,235	27	,000	,276	,311	,143
periodo * tratamiento	,000	685,763	230	,000	,283	,373	,048

Contrasta la hipótesis nula de que la matriz de covarianza error de las variables dependientes transformadas es proporcional a una matriz identidad.

^a Puede usarse para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas. Las pruebas corregidas se muestran en la tabla Pruebas de los efectos inter-sujetos.

^b Diseño: Intersección+raza

Diseño intra sujetos: periodo+tratamiento+periodo*tratamiento

Tabla E37 Pruebas de efectos intra-sujetos

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Periodo	Esfericidad asumida	3897,819	3	1299,273	17,154	,000
	Greenhouse-Geisser	3897,819	2,309	1688,038	17,154	,000
	Huynh-Feldt	3897,819	2,643	1474,573	17,154	,000
	Límite-inferior	3897,819	1,000	3897,819	17,154	,000
Periodo * raza	Esfericidad asumida	2866,847	6	477,808	6,308	,000
	Greenhouse-Geisser	2866,847	4,618	620,776	6,308	,000
	Huynh-Feldt	2866,847	5,287	542,274	6,308	,000
	Límite-inferior	2866,847	2,000	1433,423	6,308	,005
Error (periodo)	Esfericidad asumida	7498,449	99	75,742		
	Greenhouse-Geisser	7498,449	76,200	98,405		
	Huynh-Feldt	7498,449	87,231	85,961		
	Límite-inferior	7498,449	33,000	227,226		
Tratamiento	Esfericidad asumida	31873,377	7	4553,340	297,058	,000
	Greenhouse-Geisser	31873,377	1,935	16474,162	297,058	,000
	Huynh-Feldt	31873,377	2,178	14636,217	297,058	,000
	Límite-inferior	31873,377	1,000	31873,377	297,058	,000
Tratamiento * raza	Esfericidad asumida	462,578	14	33,041	2,156	,010
	Greenhouse-Geisser	462,578	3,869	119,545	2,156	,086
	Huynh-Feldt	462,578	4,355	106,208	2,156	,077
	Límite-inferior	462,578	2,000	231,289	2,156	,132

Error (tratamiento)	Esfericidad asumida	3540,796	231	15,328		
	Greenhouse-Geisser	3540,796	63,847	55,458		
	Huynh-Feldt	3540,796	71,864	49,271		
	Límite-inferior	3540,796	33,000	107,297		
Periodo * tratamiento	Esfericidad asumida	1490,525	21	70,977	10,469	,000
	Greenhouse-Geisser	1490,525	5,940	250,937	10,469	,000
	Huynh-Feldt	1490,525	7,828	190,403	10,469	,000
	Límite-inferior	1490,525	1,000	1490,525	10,469	,003
Periodo * tratamiento * raza	Esfericidad asumida	1126,020	42	26,810	3,954	,000
	Greenhouse-Geisser	1126,020	11,880	94,785	3,954	,000
	Huynh-Feldt	1126,020	15,657	71,920	3,954	,000
	Límite-inferior	1126,020	2,000	563,010	3,954	,029
Error(Periodo * tratamiento)	Esfericidad asumida	4698,579	693	6,780		
	Greenhouse-Geisser	4698,579	196,015	23,971		
	Huynh-Feldt	4698,579	258,333	18,188		
	Límite-inferior	4698,579	33,000	142,381		

La **Tabla E38** recoge los resultados de las pruebas de los efectos inter-sujetos debidos al factor **Raza**. Se puede concluir que este factor tiene una influencia significativa en las medidas obtenidas.

Tabla E38 Pruebas de los efectos inter-sujetos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección raza	158013,807	1	158013,807	1874,849	,000
Error	7548,363	2	3774,181	44,781	,000
	2781,267	33	84,281		

A continuación se presentan las **Tablas E39 y E40** de estimaciones de las respuestas medias y de comparaciones por pares.

Tabla E39 Estimaciones

raza	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	9,347	,468	8,394	10,301
2	15,268	,468	14,315	16,221
3	10,520	,468	9,567	11,473

Tabla E40 Comparaciones múltiples

(I) raza	(J) raza	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-5,9205*	,66254	,000	-7,5916	-4,2494
	3	-1,1724	,66254	,258	-2,8435	,4987
2	1	5,9205*	,66254	,000	4,2494	7,5916
	3	4,7481*	,66254	,000	3,0770	6,4192
3	1	1,1724	,66254	,258	-,4987	2,8435
	2	-4,7481*	,66254	,000	-6,4192	-3,0770

Basado en las medias observadas.

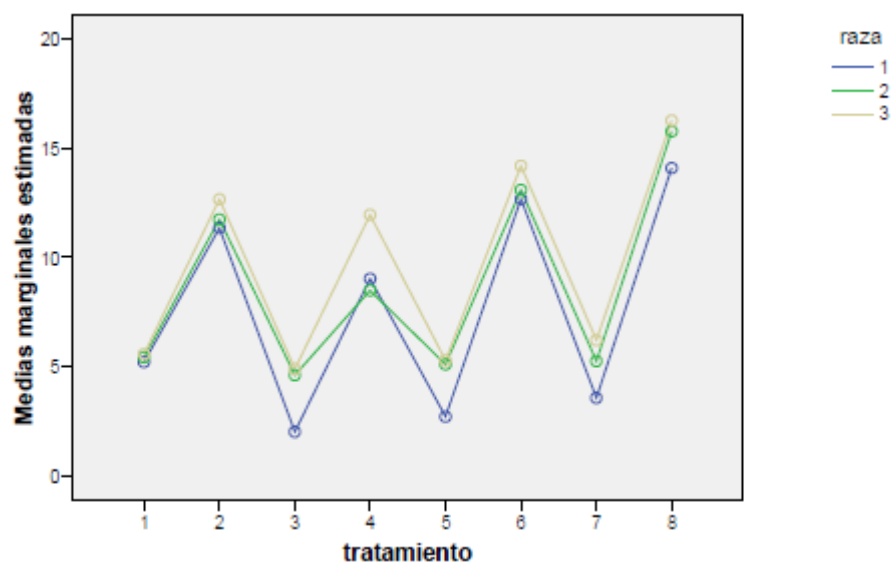
* La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

Se aprecian diferencias significativas entre la raza 2 y las razas 1 y 3.

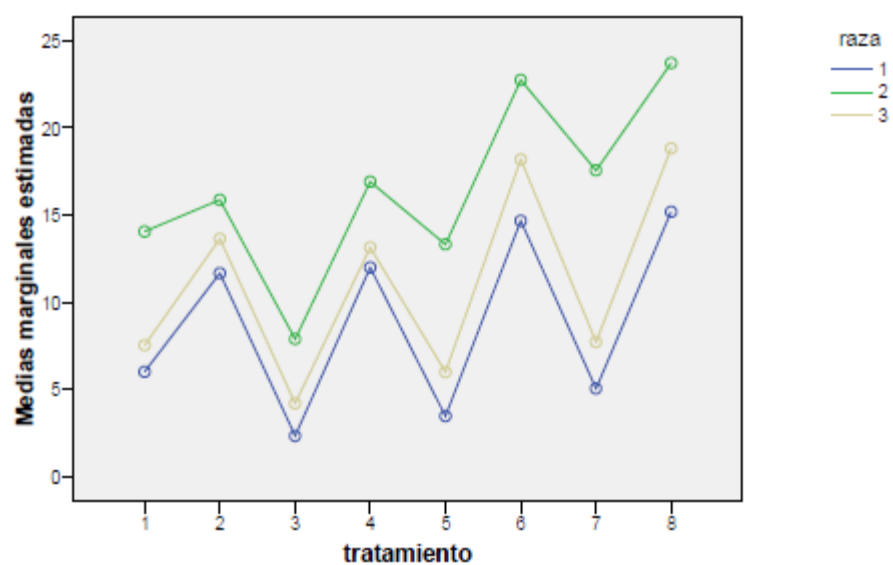
Las **Gráficas E48, E49, E50 y E51** de perfil correspondientes a la combinación **Tratamiento*Raza*Periodo** muestran el diferente comportamiento de las tres razas. Puede observarse como, salvo en el periodo 1, la raza 2 ofrece una respuesta claramente diferenciada de las dos restantes.

Gráfica E48

para el periodo 1

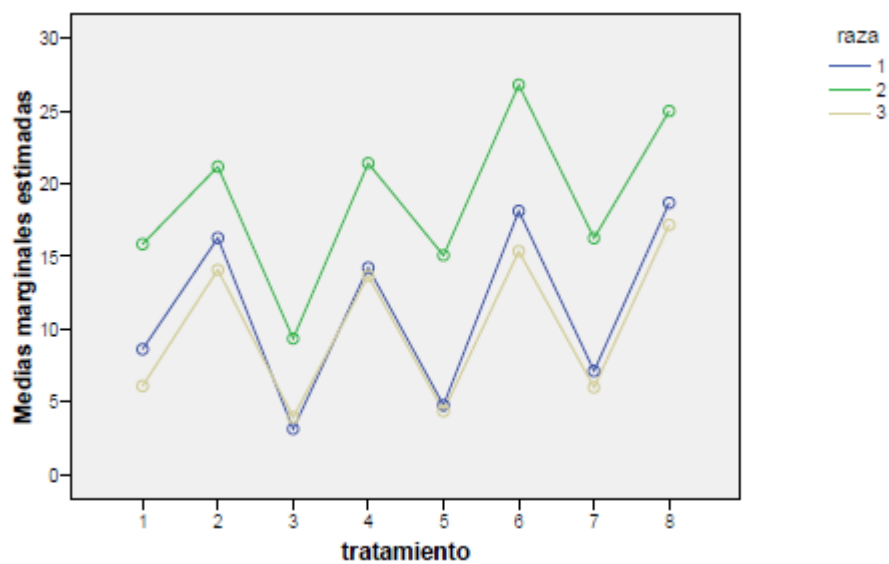
**Gráfica E49**

para el periodo 2

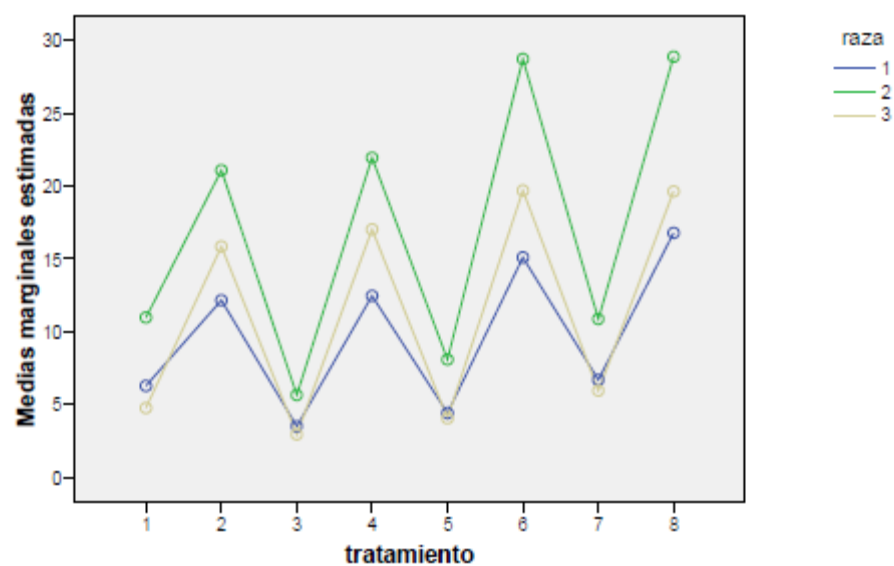


Gráfica E50

para el periodo 3

**Gráfica E51**

para el periodo 4



A continuación se presentan las estimaciones de las respuestas medias y comparaciones por pares para los factores **Tratamiento** y **Periodo**.

1. Tratamiento

Las **Tablas E41 y E42** ofrecen los resultados de las estimaciones de medias e intervalos de confianza, así como comparaciones por pares.

Tabla E41 Estimaciones

tratamiento	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	8,023	,274	7,466	8,580
2	14,791	,283	14,216	15,366
3	4,527	,246	4,026	5,028
4	14,350	,509	13,314	15,386
5	6,376	,400	5,563	7,190
6	18,280	,540	17,182	19,378
7	8,179	,371	7,424	8,935
8	19,167	,516	18,116	20,217

Tabla E42 Comparaciones por pares

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite sup.
1	2	-6,768*	,399	,000	-7,579	-5,958
	3	3,496*	,284	,000	2,919	4,073
	4	-6,328*	,661	,000	-7,672	-4,983
	5	1,646*	,374	,000	,886	2,406
	6	-10,257*	,666	,000	-11,613	-8,902
	7	-,157	,340	,648	-,849	,536
	8	-11,144*	,614	,000	-12,394	-9,894
2	1	6,768*	,399	,000	5,958	7,579
	3	10,264*	,313	,000	9,627	10,901
	4	,441	,418	,299	-,410	1,292
	5	8,415*	,407	,000	7,586	9,243
	6	-3,489*	,391	,000	-4,285	-2,693
	7	6,612*	,423	,000	5,752	7,472
	8	-4,376*	,355	,000	-5,099	-3,653
3	1	-3,496*	,284	,000	-4,073	-2,919
	2	-10,264*	,313	,000	-10,901	-9,627
	4	-9,823*	,529	,000	-10,900	-8,747
	5	-1,850*	,214	,000	-2,284	-1,415
	6	-13,753*	,533	,000	-14,838	-12,668
	7	-3,652*	,202	,000	-4,064	-3,240
	8	-14,640*	,467	,000	-15,589	-13,691
4	1	6,328*	,661	,000	4,983	7,672
	2	-,441	,418	,299	-1,292	,410
	3	9,823*	,529	,000	8,747	10,900
	5	7,974*	,647	,000	6,658	9,290
	6	-3,930*	,255	,000	-4,448	-3,411
	7	6,171*	,662	,000	4,824	7,518
	8	-4,817*	,339	,000	-5,507	-4,126
5	1	-1,646*	,374	,000	-2,406	-,886
	2	-8,415*	,407	,000	-9,243	-7,586
	3	1,850*	,214	,000	1,415	2,284
	4	-7,974*	,647	,000	-9,290	-6,658
	6	-11,904*	,590	,000	-13,104	-10,704
	7	-1,803*	,153	,000	-2,114	-1,492
	8	-12,790*	,531	,000	-13,870	-11,711
6	1	10,257*	,666	,000	8,902	11,613
	2	3,489*	,391	,000	2,693	4,285
	3	13,753*	,533	,000	12,668	14,838
	4	3,930*	,255	,000	3,411	4,448
	5	11,904*	,590	,000	10,704	13,104
	7	10,101*	,631	,000	8,816	11,385
	8	-,887*	,263	,002	-1,422	-,351
7	1	,157	,340	,648	-,536	,849
	2	-6,612*	,423	,000	-7,472	-5,752
	3	3,652*	,202	,000	3,240	4,064
	4	-6,171*	,662	,000	-7,518	-4,824
	5	1,803*	,153	,000	1,492	2,114
	6	-10,101*	,631	,000	-11,385	-8,816
	8	-10,988*	,534	,000	-12,073	-9,902

8	1	11,144*	,614	,000	9,894	12,394
	2	4,376*	,355	,000	3,653	5,099
	3	14,640*	,467	,000	13,691	15,589
	4	4,817*	,339	,000	4,126	5,507
	5	12,790*	,531	,000	11,711	13,870
	6	,887*	,263	,002	,351	1,422
	7	10,988*	,534	,000	9,902	12,073

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

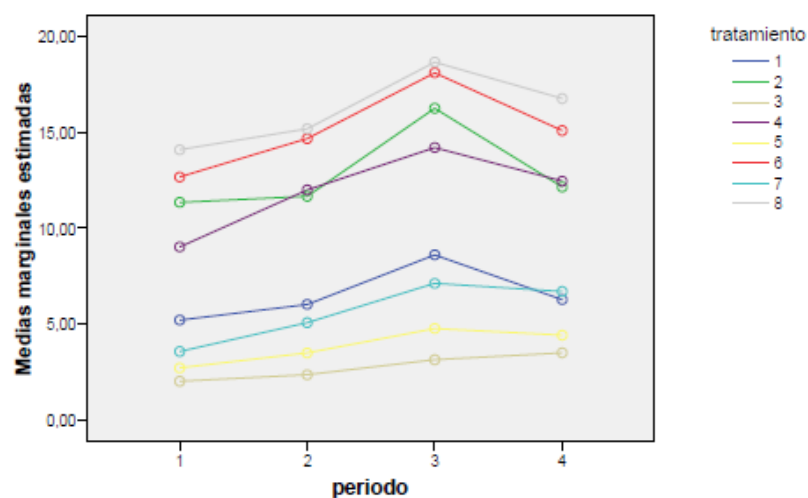
^a Ajuste para comparaciones múltiples: diferencia menos significativa (equivalente a la ausencia de ajuste).

Existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, con excepción de los tratamientos 1 y 7, y 2 y 4.

Las **Gráficas E52, E53 y E54** de perfil correspondientes a la combinación **Periodo*Tratamiento*Raza** muestran el diferente comportamiento de los tratamientos.

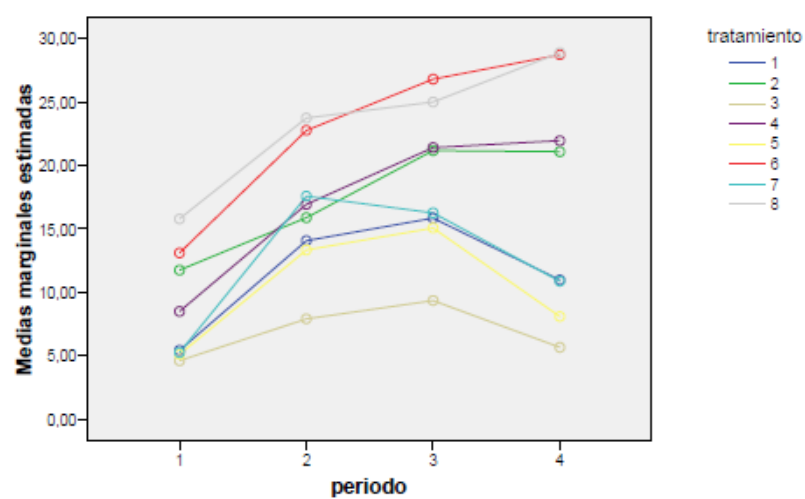
Gráfica E52

para la raza 1



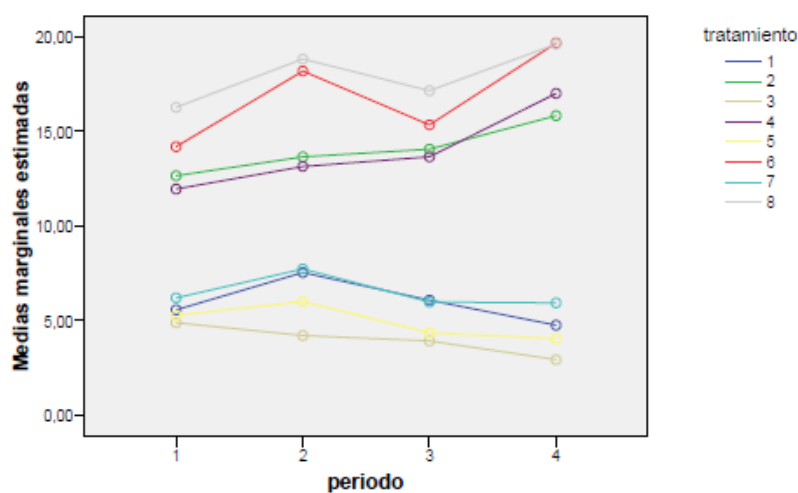
Gráfica E53

para la raza 2



Gráfica E54

para la raza 3



2. Periodo

Las **Tablas E43 y E44** ofrecen los resultados de las estimaciones de medias e intervalos de confianza, así como comparaciones por pares, para este factor significativo.

Tabla E43 Estimaciones

periodo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	8,624	,207	8,202	9,045
2	12,160	,544	11,054	13,266
3	13,427	,705	11,993	14,862
4	12,636	,496	11,627	13,646

Tabla E44 Comparaciones por pares

(I) periodo	(J) periodo	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-3,536*	,543	,000	-4,642	-2,431
	3	-4,803*	,736	,000	-6,302	-3,305
	4	-4,013*	,527	,000	-5,085	-2,940
2	1	3,536*	,543	,000	2,431	4,642
	3	-1,267	,894	,166	-3,086	,551
	4	-,476	,825	,567	-2,154	1,201
3	1	4,803*	,736	,000	3,305	6,302
	2	1,267	,894	,166	-,551	3,086
	4	,791	,749	,299	-,734	2,316
4	1	4,013*	,527	,000	2,940	5,085
	2	,476	,825	,567	-1,201	2,154
	3	-,791	,749	,299	-2,316	,734

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

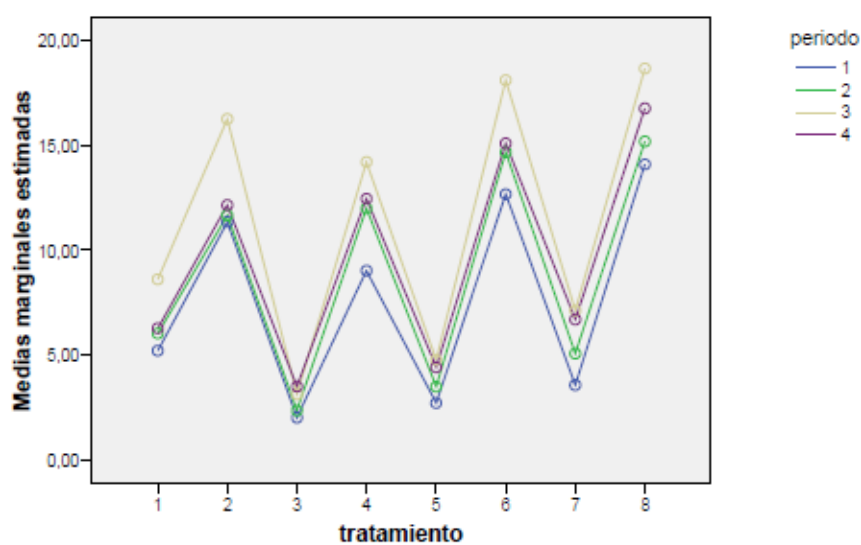
^a Ajuste para comparaciones múltiples: diferencia menos significativa (equivalente a la ausencia de ajuste).

La respuesta medida en el periodo 1 es significativamente distinta de las obtenidas en los restantes tres periodos.

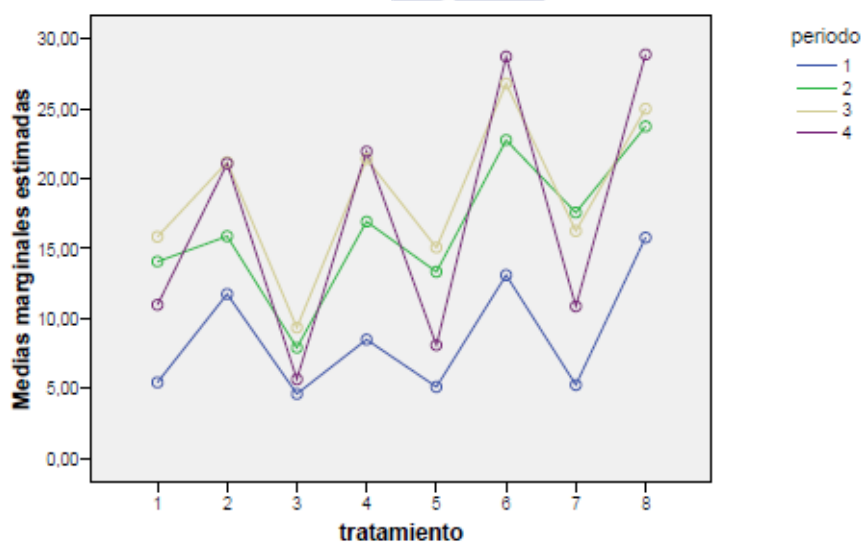
Las **Gráficas E55, E56 y E57** de perfil correspondientes a la combinación **Tratamiento*Periodo*Raza** muestran el comportamiento de los distintos periodos.

Grafica E55

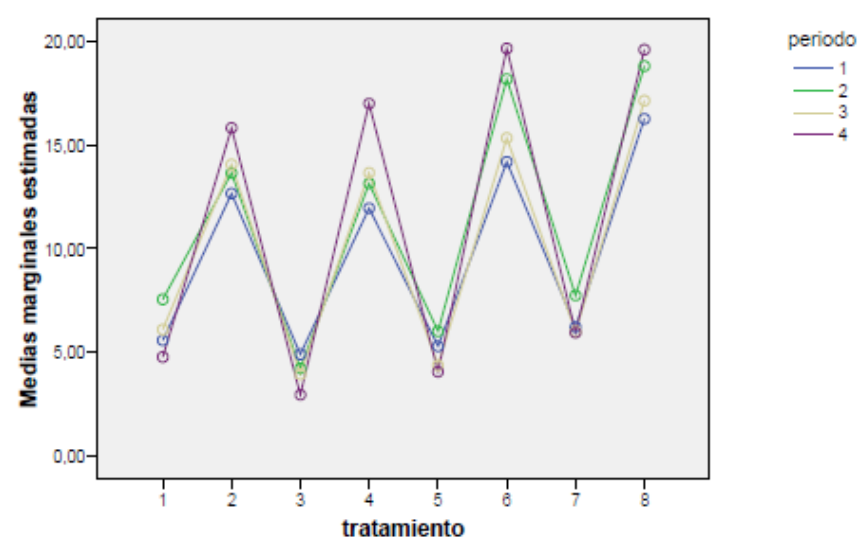
para la raza 1

**Grafica E56**

para la raza 2

**Grafica E57**

para la raza 3



C3. Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro

En primer lugar se ha considerado la condición de **esfericidad** (igualdad de matrices de dispersión) para determinar si se dan las condiciones para utilizar la prueba F al contrastar los factores intra-sujetos. Para ello se ha aplicado de nuevo el test de Mauchly, cuyos resultados se muestran en la **Tabla E45**.

De acuerdo con la columna **Significación**, se rechaza la condición de esfericidad, pues el valor más alto es $0,008 < 0,05$.

A continuación la **Tabla E46** recoge los resultados de las pruebas de los efectos intra-sujetos. De acuerdo con la columna de **Significación** (omitiendo las filas de **Esfericidad asumida** por no cumplirse esta condición), se puede concluir que son significativos los factores **Tratamiento** (el mayor nivel de significación obtenido para este factor es $0,000 < 0,05$) y **Periodo** (el mayor nivel de significación obtenido para este factor es $0,001 < 0,05$).

Todas las interacciones son significativas, excepto **Tratamiento*Raza** (el nivel de significación más bajo es $0,077 > 0,05$, correspondiente al test de Huynh-Feldt).

Tabla E45 Prueba de esfericidad de Mauchly^b

Efecto intra-sujetos	W de Mauchy	Chi-cuadrado	gl	Significación	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Periodo	,613	15,550	5	,008	,773	,886	,333
tratamiento	,000	344,837	27	,000	,215	,236	,143
periodo * tratamiento	,000	790,560	230	,000	,234	,297	,048

Contrasta la hipótesis nula de que la matriz de covarianza error de las variables dependientes transformadas es proporcional a una matriz identidad.

^a Puede usarse para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas. Las pruebas corregidas se muestran en la tabla Pruebas de los efectos inter-sujetos.

^b Diseño: Intersección+raza

Diseño intra sujetos: periodo+tratamiento+periodo*tratamiento

Tabla E46 Pruebas de efectos intra-sujetos

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Periodo	Esfericidad asumida	14029,144	3	4676,381	13,334	,000
	Greenhouse-Geisser	14029,144	2,320	6047,309	13,334	,000
	Huynh-Feldt	14029,144	2,657	5280,113	13,334	,000
	Límite-inferior	14029,144	1,000	14029,144	13,334	,001
Periodo * raza	Esfericidad asumida	19751,297	6	3291,883	9,386	,000
	Greenhouse-Geisser	19751,297	4,640	4256,931	9,386	,000
	Huynh-Feldt	19751,297	5,314	3716,872	9,386	,000
	Límite-inferior	19751,297	2,000	9875,648	9,386	,001
Error (periodo)	Esfericidad asumida	34721,307	99	350,720		
	Greenhouse-Geisser	34721,307	76,557	453,537		
	Huynh-Feldt	34721,307	87,680	395,999		
	Límite-inferior	34721,307	33,000	1052,161		
Tratamiento	Esfericidad asumida	489953,487	7	69993,355	811,838	,000
	Greenhouse-Geisser	489953,487	1,502	326137,945	811,838	,000
	Huynh-Feldt	489953,487	1,654	296307,597	811,838	,000
	Límite-inferior	489953,487	1,000	489953,487	811,838	,000

Tratamiento * raza	Esfericidad asumida	2828,170	14	202,012	2,343	,005
	Greenhouse-Geisser	2828,170	3,005	941,287	2,343	,084
	Huynh-Feldt	2828,170	3,307	364,984	2,343	,077
	Límite-inferior	2828,170	2,000	603,512	2,343	,112
Error (tratamiento)	Esfericidad asumida	19915,885	231	86,216		
	Greenhouse-Geisser	19915,885	49,576	401,728		
	Huynh-Feldt	19915,885	54,566	855,192		
	Límite-inferior	19915,885	33,000	1414,085		
Periodo * tratamiento	Esfericidad asumida	8627,263	21	410,822	17,254	,000
	Greenhouse-Geisser	8627,263	4,917	1754,595	17,254	,000
	Huynh-Feldt	8627,263	6,232	1384,374	17,254	,000
	Límite-inferior	8627,263	1,000	8627,263	17,254	,000
Periodo * tratamiento * raza	Esfericidad asumida	3987,088	42	94,931	3,987	,000
	Greenhouse-Geisser	3987,088	9,834	405,443	3,987	,000
	Huynh-Feldt	3987,088	12,464	319,894	3,987	,000
	Límite-inferior	3987,088	2,000	1993,544	3,987	,028
Error(Periodo * tratamiento)	Esfericidad asumida	16500,927	693	23,811		
	Greenhouse-Geisser	16500,927	162,259	101,695		
	Huynh-Feldt	16500,927	205,652	80,237		
	Límite-inferior	16500,927	33,000	500,028		

La **Tabla E47** recoge los resultados de las pruebas de los efectos inter-sujetos debidos al factor **Raza**. Se puede concluir que este factor tiene una influencia significativa en las medidas obtenidas.

Tabla E47 Pruebas de los efectos inter-sujetos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección raza	2544944,723	1	2544944,72	3480,276	,000
Error	39019,744	2	19509,872	26,680	,000
	24131,182	33	731,248		

A continuación se presentan las **Tablas E48 y E49** de estimaciones de las respuestas medias y de comparaciones por pares para el factor **Raza**.

Tabla E48 Estimaciones

raza	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	55,028	1,380	52,220	57,835
2	41,409	1,380	38,601	44,217
3	44,568	1,380	41,761	47,376

Tabla E49 Comparaciones múltiples

(I) raza	(J) raza	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	13,6186*	1,95156	,000	8,6963	18,5408
	3	10,4592*	1,95156	,000	5,5369	15,3814
2	1	-13,6186*	1,95156	,000	-18,5408	-8,6963
	3	-3,1594	1,95156	,345	-8,0816	1,7629
3	1	-10,4592*	1,95156	,000	-15,3814	-5,5369
	2	3,1594	1,95156	,345	-1,7629	8,0816

Basado en las medias observadas.

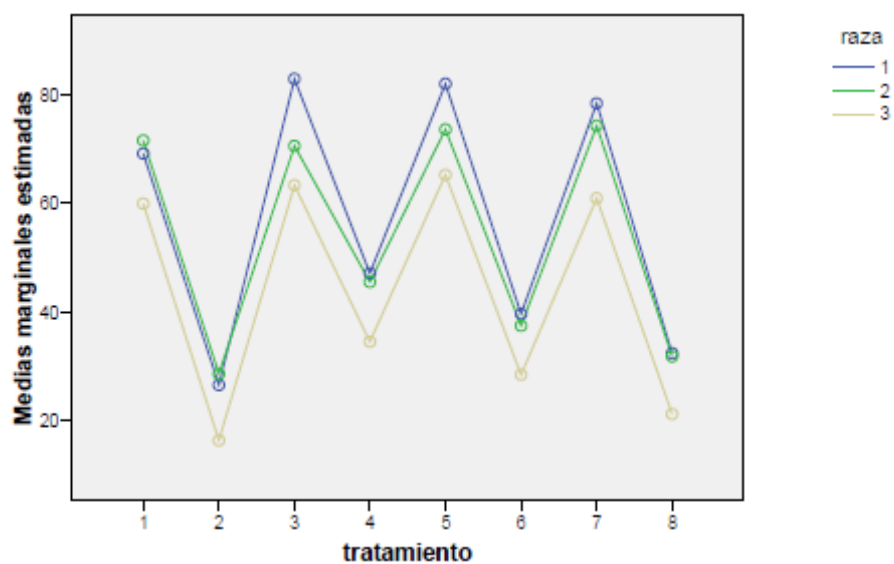
* La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

Existen diferencias significativas entre la raza 1 y las razas 2 y 3.

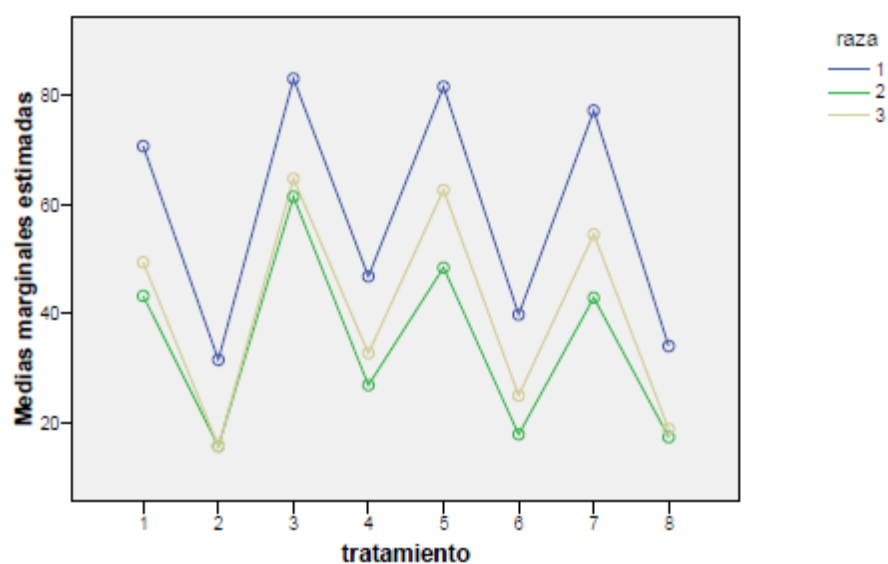
Las **Gráficas E58, E59, E60 y E61** de perfil correspondientes a la combinación **Tratamiento*Raza*Periodo** muestran el comportamiento de las tres razas.

Gráfica E58

para el periodo 1

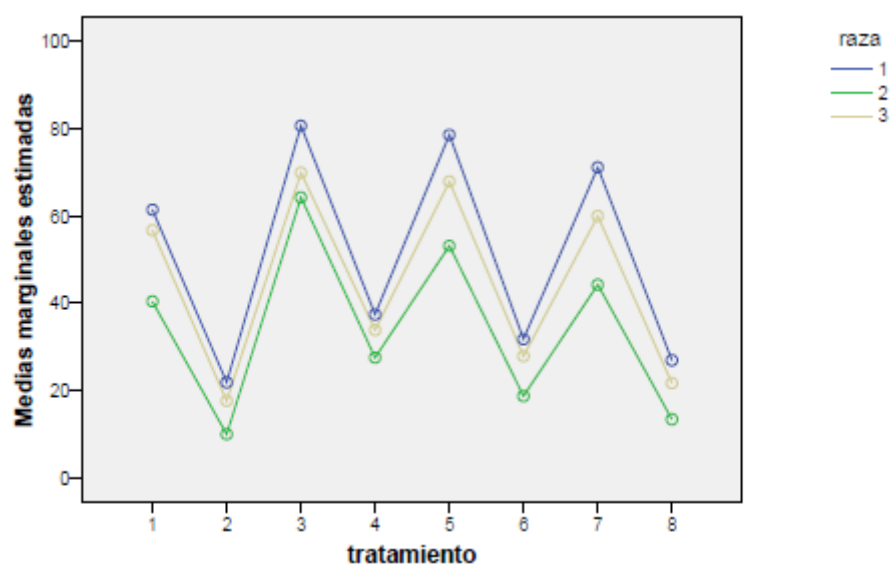
**Gráfica E59**

para el periodo 2

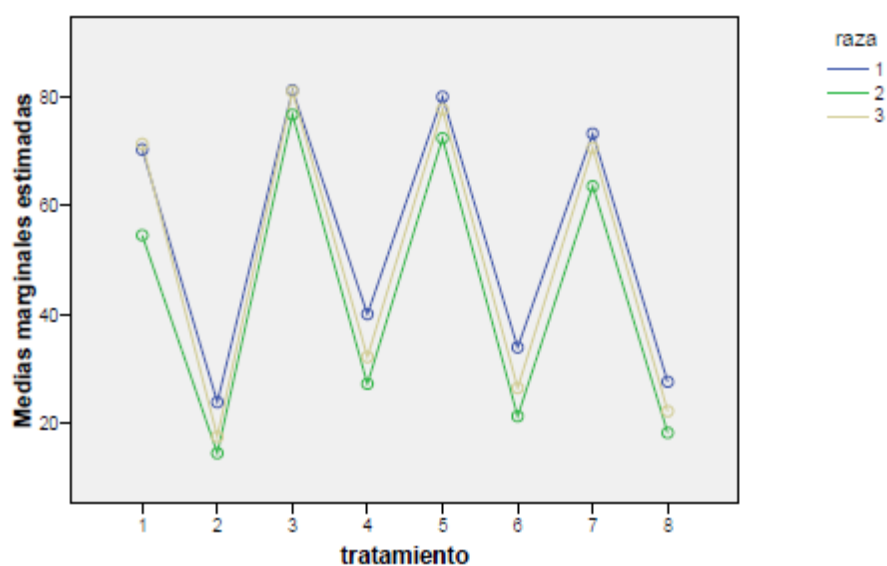


Gráfica E60

para el periodo 3

**Gráfica E61**

para el periodo 4



A continuación para los factores **Tratamiento** y **Periodo** se presentan estimaciones y comparaciones por pares.

1. Tratamiento

Las **Tablas E50 y E51** ofrecen los resultados para este factor, con las estimaciones para los efectos medios y las comparaciones por pares.

Tabla E50 Estimaciones

tratamiento	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	59,817	1,519	56,727	62,907
2	19,948	,538	18,854	21,043
3	73,220	1,412	70,347	76,092
4	35,940	,285	35,360	36,520
5	70,177	1,400	67,328	73,026
6	28,974	,252	28,461	29,486
7	64,170	1,548	61,019	67,320
8	23,768	,420	22,914	24,623

Tabla E51 Comparaciones por pares

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite sup.
1	2	39,868*	1,327	,000	37,168	42,569
	3	-13,403*	,647	,000	-14,719	-12,086
	4	23,877*	1,489	,000	20,848	26,906
	5	-10,360*	,782	,000	-11,951	-8,769
	6	30,843*	1,434	,000	27,925	33,762
	7	-4,353*	,731	,000	-5,840	-2,865
	8	36,048*	1,343	,000	33,316	38,781
	1	-39,868*	1,327	,000	-42,569	-37,168
2	3	-53,271*	1,348	,000	-56,013	-50,529
	4	-15,991*	,664	,000	-17,343	-14,640
	5	-50,228*	1,351	,000	-52,977	-47,479
	6	-9,025*	,480	,000	-10,003	-8,048
	7	-44,221*	1,449	,000	-47,169	-41,273
	8	-3,820*	,348	,000	-4,527	-3,113
	1	13,403*	,647	,000	12,086	14,719
	2	53,271*	1,348	,000	50,529	56,013
3	4	37,280*	1,349	,000	34,536	40,023
	5	3,043*	,382	,000	2,265	3,821
	6	44,246*	1,319	,000	41,562	46,929
	7	9,050*	,395	,000	8,247	9,853
	8	49,451*	1,275	,000	46,856	52,046
	1	-23,877*	1,489	,000	-26,906	-20,848
	2	15,991*	,664	,000	14,640	17,343
	3	-37,280*	1,349	,000	-40,023	-34,536
4	5	-34,237*	1,364	,000	-37,013	-31,461
	6	6,966*	,328	,000	6,300	7,633
	7	-28,230*	1,533	,000	-31,348	-25,111
	8	12,171*	,540	,000	11,073	13,270
5	1	10,360*	,782	,000	8,769	11,951
	2	50,228*	1,351	,000	47,479	52,977
	3	-3,043*	,382	,000	-3,821	-2,265
	4	34,237*	1,364	,000	31,461	37,013
	6	41,203*	1,296	,000	38,567	43,839
	7	6,007*	,404	,000	5,184	6,830
	8	46,408*	1,247	,000	43,870	48,946
6	1	-30,843*	1,434	,000	-33,762	-27,925
	2	9,025*	,480	,000	8,048	10,003
	3	-44,246*	1,319	,000	-46,929	-41,562
	4	-6,966*	,328	,000	-7,633	-6,300
	5	-41,203*	1,296	,000	-43,839	-38,567
	7	-35,196*	1,457	,000	-38,161	-32,231
	8	5,205*	,310	,000	4,574	5,837
7	1	4,353*	,731	,000	2,865	5,840
	2	44,221*	1,449	,000	41,273	47,169
	3	-9,050*	,395	,000	-9,853	-8,247
	4	28,230*	1,533	,000	25,111	31,348
	5	-6,007*	,404	,000	-6,830	-5,184
	6	35,196*	1,457	,000	32,231	38,161
	8	40,401*	1,369	,000	37,615	43,187

8	1	-36,048*	1,343	,000	-38,781	-33,316
	2	3,820*	,348	,000	3,113	4,527
	3	-49,451*	1,275	,000	-52,046	-46,856
	4	-12,171*	,540	,000	-13,270	-11,073
	5	-46,408*	1,247	,000	-48,946	-43,870
	6	-5,205*	,310	,000	-5,837	-4,574
	7	-40,401*	1,369	,000	-43,187	-37,615

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

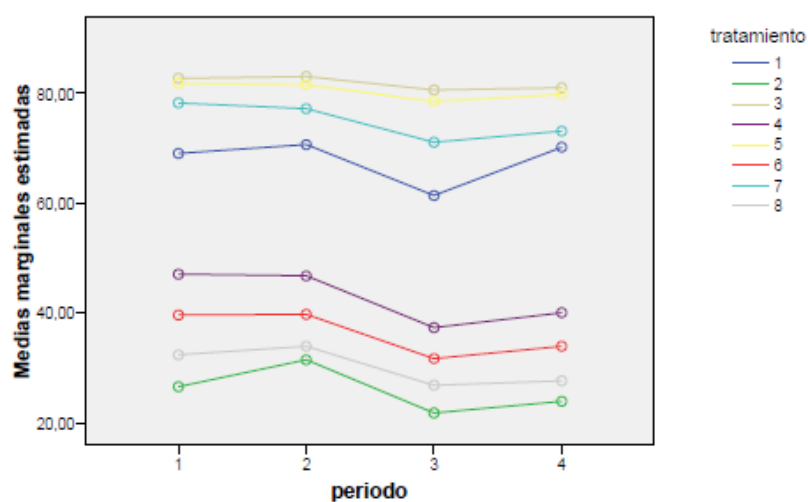
^a Ajuste para comparaciones múltiples: diferencia menos significativa (equivalente a ausencia de ajuste).

Existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

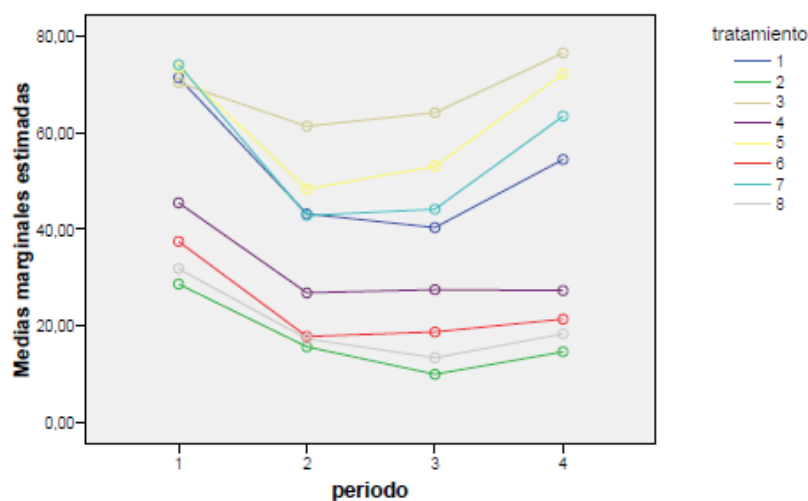
Las **Gráficas E62, E63 y E64** de perfil correspondientes a la combinación **Periodo*Tratamiento*Raza** muestran el comportamiento de los tratamientos.

Gráfica E62

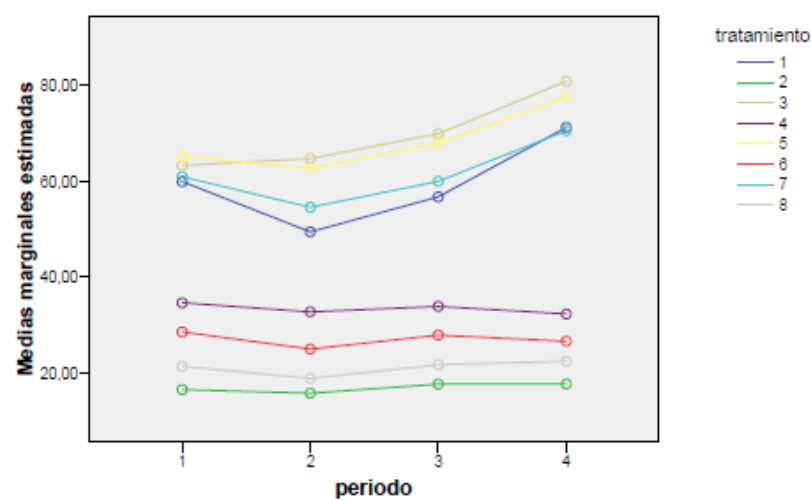
para la raza 1

**Gráfica E63**

para la raza 2

**Gráfica E64**

para la raza 3



2. Periodo

Las **Tablas E52 y E53** ofrecen los resultados para este factor, con las estimaciones para los efectos medios y las comparaciones por pares.

Tabla E52 Estimaciones

periodo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	51,665	1,208	49,208	54,122
2	44,184	1,365	41,406	46,962
3	43,135	1,498	40,087	46,184
4	49,022	,790	47,414	50,630

Tabla E53 Comparaciones por pares

(I) periodo	(J) periodo	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	7,481*	1,129	,000	5,184	9,777
	3	8,530*	1,971	,000	4,519	12,540
	4	2,643	1,513	,090	-,434	5,721
2	1	-7,481*	1,129	,000	-9,777	-5,184
	3	1,049	1,624	,523	-2,256	4,354
	4	-4,837*	1,496	,003	-7,880	-1,794
3	1	-8,530*	1,971	,000	-12,540	-4,519
	2	-1,049	1,624	,523	-4,354	2,256
	4	-5,886*	1,513	,000	-8,964	-2,808
4	1	-2,643	1,513	,090	-5,721	,434
	2	4,837*	1,496	,003	1,794	7,880
	3	5,886*	1,513	,000	2,808	8,964

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

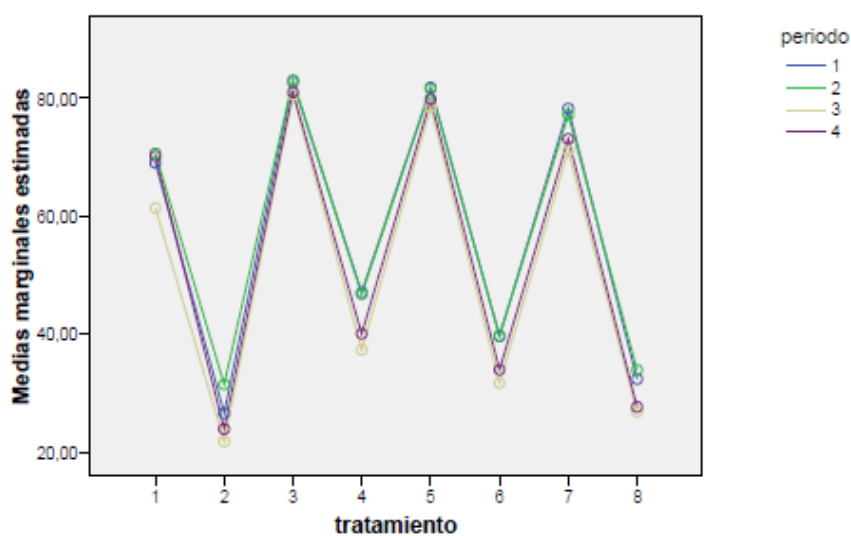
^a Ajuste para comparaciones múltiples: diferencia menos significativa (equivalente a ausencia de ajuste).

Las respuestas medidas en los periodos 1 y 4 (con respuestas medias 51,665 y 49,022, respectivamente) son significativamente distintas de las obtenidas en los periodos 2 y 3 (con respuestas medias respectivas 44,184 y 43,135).

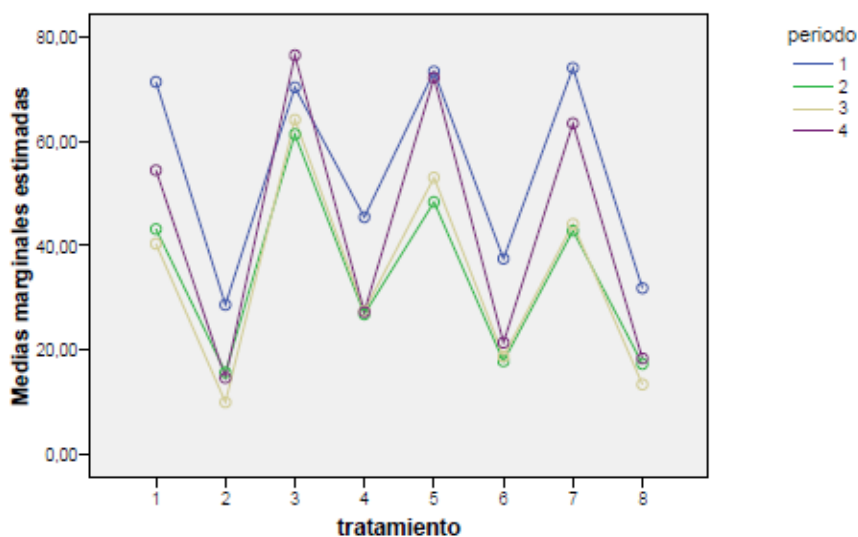
Las **Gráficas E65, E66 y E67** de perfil muestran el diferente comportamiento observado en los cuatro períodos.

Gráfica E65

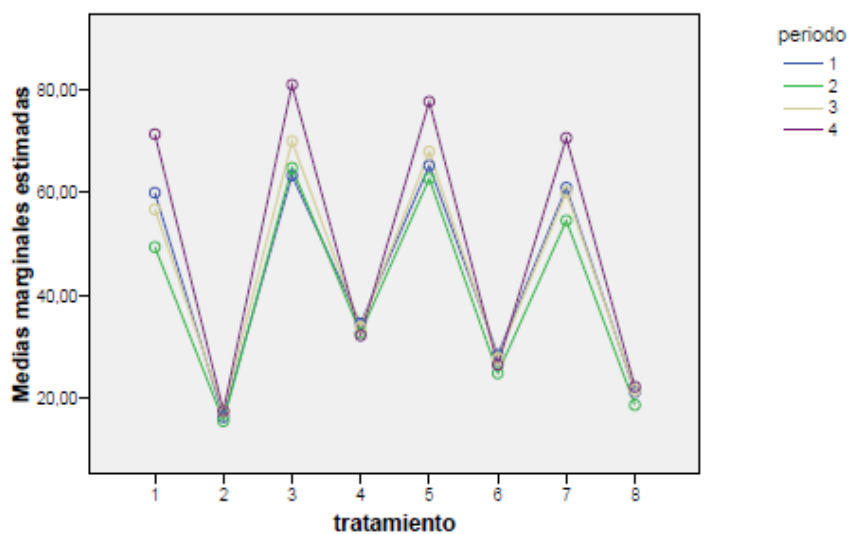
para la raza 1

**Gráfica E66**

para la raza 2

**Gráfica E67**

para la raza 3



C4. porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma íntegro

En primer lugar se ha considerado la condición de **esfericidad** (igualdad de matrices de dispersión) para determinar si se dan las condiciones para utilizar la prueba F al contrastar los factores intra-sujetos. Para ello se ha aplicado de nuevo el test de Mauchly, cuyos resultados se muestran en la **Tabla E54**.

De acuerdo con la columna **Significación**, se rechaza la condición de esfericidad, pues el valor más alto es $0,001 < 0,05$.

A continuación la **Tabla E55** recoge los resultados de las pruebas de los efectos intra-sujetos. De acuerdo con la columna **Significación** (omitiendo las filas de **Esfericidad asumida** por no cumplirse esta condición), se puede concluir que son significativos los factores **Tratamiento** y **Periodo** (el mayor nivel de significación obtenido para estos factores $0,000 < 0,05$). También resultan significativas todas las interacciones.

Tabla E54 Prueba de esfericidad de Mauchly^b

Efecto intra-sujetos	W de Mauchy	Chi-cuadrado	gl	Significación	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Periodo	,502	21,861	5	,001	,670	,756	,333
tratamiento	,013	132,629	27	,000	,426	,502	,143
periodo * tratamiento	,000	678,598	230	,000	,281	,370	,048

Contrasta la hipótesis nula de que la matriz de covarianza error de las variables dependientes transformadas es proporcional a una matriz identidad.

^a Puede usarse para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas. Las pruebas corregidas se muestran en la tabla Pruebas de los efectos inter-sujetos.

^b Diseño: Intersección+raza

Diseño intra sujetos: periodo+tratamiento+periodo*tratamiento

Tabla E55 Pruebas de efectos intra-sujetos

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	GI	Media cuadrática	F	Significación
Periodo	Esfericidad asumida	15418,859	3	5139,620	16,553	,000
	Greenhouse-Geisser	15418,859	2,009	7674,059	16,553	,000
	Huynh-Feldt	15418,859	2,269	6794,112	16,553	,000
	Límite-inferior	15418,859	1,000	15418,859	16,553	,000
Periodo * raza	Esfericidad asumida	11973,525	6	1995,587	6,427	,000
	Greenhouse-Geisser	11973,525	4,018	2979,648	6,427	,000
	Huynh-Feldt	11973,525	4,539	2637,986	6,427	,000
	Límite-inferior	11973,525	2,000	5986,762	6,427	,004
Error (periodo)	Esfericidad asumida	30738,452	99	310,489		
	Greenhouse-Geisser	30738,452	66,304	463,597		
	Huynh-Feldt	30738,452	74,892	410,439		
	Límite-inferior	30738,452	33,000	931,468		
Tratamiento	Esfericidad asumida	20788,483	7	2969,783	112,113	,000
	Greenhouse-Geisser	20788,483	2,983	6968,527	112,113	,000
	Huynh-Feldt	20788,483	3,511	5920,617	112,113	,000
	Límite-inferior	20788,483	1,000	20788,483	112,113	,000

Tratamiento * raza	Esfericidad asumida	1373,171	14	98,084	3,703	,000
	Greenhouse-Geisser	1373,171	5,966	230,151	3,703	,002
	Huynh-Feldt	1373,171	7,022	195,541	3,703	,001
	Límite-inferior	1373,171	2,000	686,585	3,703	,035
Error (tratamiento)	Esfericidad asumida	6118,994	231	26,489		
	Greenhouse-Geisser	6118,994	98,445	62,156		
	Huynh-Feldt	6118,994	115,870	52,809		
	Límite-inferior	6118,994	33,000	185,424		
Periodo * tratamiento	Esfericidad asumida	2838,839	21	135,183	8,631	,000
	Greenhouse-Geisser	2838,839	5,909	480,420	8,631	,000
	Huynh-Feldt	2838,839	7,779	364,960	8,631	,000
	Límite-inferior	2838,839	1,000	2838,839	8,631	,006
Periodo * tratamiento * raza	Esfericidad asumida	2338,408	42	55,676	3,555	,000
	Greenhouse-Geisser	2338,408	11,818	197,866	3,555	,000
	Huynh-Feldt	2338,408	15,557	150,312	3,555	,000
	Límite-inferior	2338,408	2,000	1169,204	3,555	,040
Error(Periodo * tratamiento)	Esfericidad asumida	10853,746	693	15,662		
	Greenhouse-Geisser	10853,746	195,000	55,660		
	Huynh-Feldt	10853,746	256,691	42,283		
	Límite-inferior	10853,746	33,000	328,901		

La **Tabla E56** recoge los resultados de las pruebas de los efectos inter-sujetos debidos al factor **Raza**. Se puede concluir que este factor tiene una influencia significativa en las medidas obtenidas.

Tabla E56 Pruebas de los efectos inter-sujetos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	899422,132	1	899422,132	594,048	,000
raza	23543,178	2	11771,589	7,775	,002
Error	49963,884	33	1514,057		

A continuación se presentan las **Tablas E57 y E58** de estimaciones de las respuestas medias y de comparaciones por pares.

Tabla E57 Estimaciones

raza	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	21,550	1,986	17,510	25,590
2	31,015	1,986	26,975	35,055
3	31,261	1,986	27,221	35,301

Tabla E58 Comparaciones múltiples

(I) raza	(J) raza	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-	2,80815	,006	-16,5473	-2,3817
	3	-	2,80815	,005	-16,7933	-2,6277
2	1	9,4645	2,80815	,006	2,3817	16,5473
	3	-,2460	2,80815	1,000	-7,3287	6,8368
3	1	9,7105	2,80815	,005	2,6277	16,7933
	2	-,2460	2,80815	1,000	-6,8368	7,3287

Basado en las medias observadas.

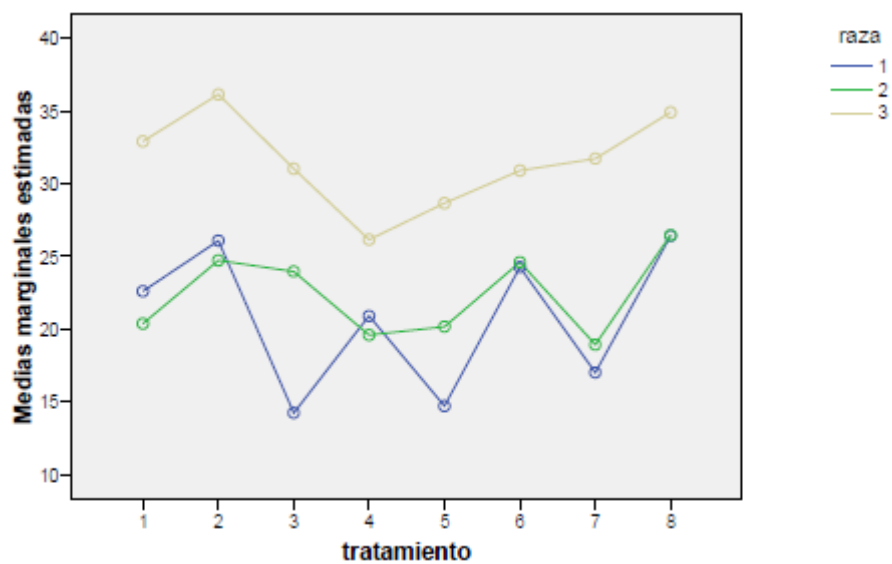
* La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

Existen diferencias significativas entre la raza 1 y las razas 2 y 3.

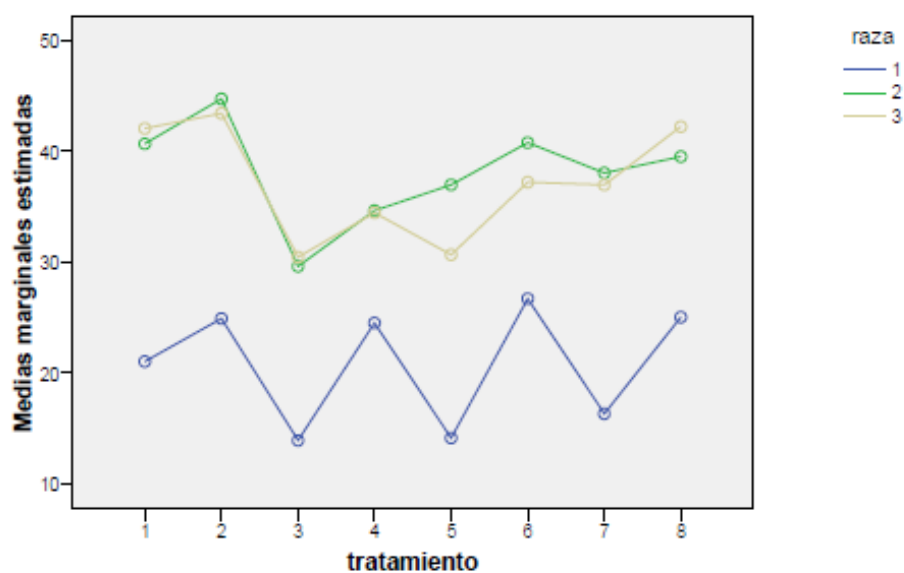
Las **Gráficas E68, E69, E70 y E71** de perfil correspondientes a la combinación **Tratamiento*Raza*Periodo** muestran el comportamiento de las tres razas.

Gráfica E68

para el periodo 1

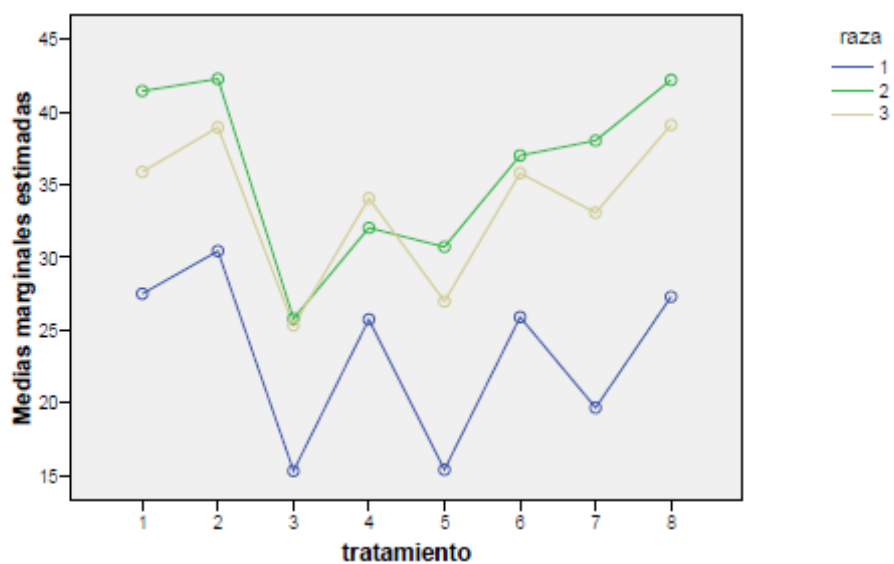
**Gráfica E69**

para el periodo 2

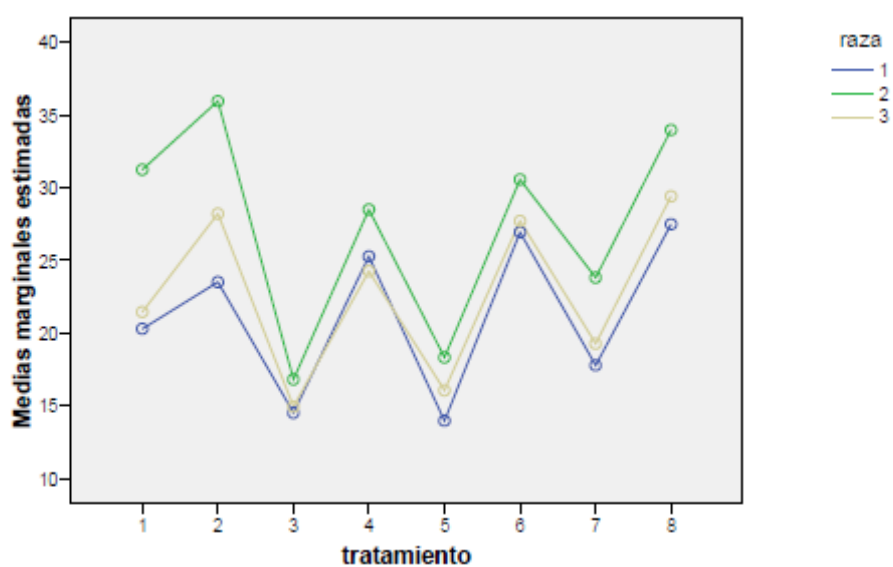


Gráfica E70

para al periodo 3

**Gráfica E71**

para al periodo 4



A continuación para los factores **Tratamiento** y **Periodo** se presentan las estimaciones de las respuestas medias y comparaciones por pares.

1. Tratamiento

Las **Tablas E59 y E60** ofrecen los resultados para este factor.

Tabla E59 Estimaciones

tratamiento	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	29,789	1,518	26,701	32,876
2	33,278	1,305	30,622	35,934
3	21,321	1,265	18,748	23,893
4	27,506	,965	25,542	29,470
5	22,227	1,198	19,790	24,664
6	30,697	,875	28,917	32,477
7	25,882	1,386	23,063	28,701
8	32,836	1,069	30,661	35,012

Tabla E60 Comparaciones por pares

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite sup.
1	2	-3,489*	,585	,000	-4,681	-2,298
	3	8,468*	,606	,000	7,236	9,700
	4	2,282*	,814	,008	,627	3,938
	5	7,561*	,637	,000	6,265	8,858
	6	-,908	,905	,323	-2,750	,934
	7	3,907*	,491	,000	2,908	4,905
	8	-3,048*	,775	,000	-4,624	-1,472
	1	3,489*	,585	,000	2,298	4,681
2	3	11,957*	,556	,000	10,826	13,089
	4	5,772*	,597	,000	4,557	6,987
	5	11,051*	,476	,000	10,083	12,018
	6	2,581*	,564	,000	1,434	3,728
	7	7,396*	,430	,000	6,522	8,271
	8	,442	,457	,341	-,489	1,372
	1	-8,468*	,606	,000	-9,700	-7,236
	2	-11,957*	,556	,000	-13,089	-10,826
3	4	-6,186*	,702	,000	-7,614	-4,757
	5	-,907*	,339	,012	-1,597	-,216
	6	-9,376*	,788	,000	-10,980	-7,772
	7	-4,561*	,371	,000	-5,316	-3,806
	8	-11,516*	,669	,000	-12,877	-10,155
	1	-2,282*	,814	,008	-3,938	-,627
	2	-5,772*	,597	,000	-6,987	-4,557
	3	6,186*	,702	,000	4,757	7,614
4	5	5,279*	,705	,000	3,844	6,714
	6	-3,191*	,444	,000	-4,095	-2,287
	7	1,624*	,713	,029	,173	3,075
	8	-5,330*	,477	,000	-6,300	-4,361
	1	-7,561*	,637	,000	-8,858	-6,265
	2	-11,051*	,476	,000	-12,018	-10,083
	3	,907*	,339	,012	,216	1,597
	4	-5,279*	,705	,000	-6,714	-3,844
5	6	-8,470*	,654	,000	-9,799	-7,140
	7	-3,655*	,409	,000	-4,487	-2,822
	8	-10,609*	,579	,000	-11,786	-9,432
	1	,908	,905	,323	-,934	2,750
	2	-2,581*	,564	,000	-3,728	-1,434
	3	9,376*	,788	,000	7,772	10,980
	4	3,191*	,444	,000	2,287	4,095
	5	8,470*	,654	,000	7,140	9,799
6	7	4,815*	,778	,000	3,232	6,398
	8	-2,140*	,385	,000	-2,923	-1,356
	1	-3,907*	,491	,000	-4,905	-2,908
	2	-7,396*	,430	,000	-8,271	-6,522
	3	4,561*	,371	,000	3,806	5,316
	4	-1,624*	,713	,029	-3,075	-,173
	5	3,655*	,409	,000	2,822	4,487
	6	-4,815*	,778	,000	-6,398	-3,232
7	8	-6,955*	,574	,000	-8,122	-5,787

8	1	3,048*	,775	,000	1,472	4,624
	2	-,442	,457	,341	-1,372	,489
	3	11,516*	,669	,000	10,155	12,877
	4	5,330*	,477	,000	4,361	6,300
	5	10,609*	,579	,000	9,432	11,786
	6	2,140*	,385	,000	1,356	2,923
	7	6,955*	,574	,000	5,787	8,122

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

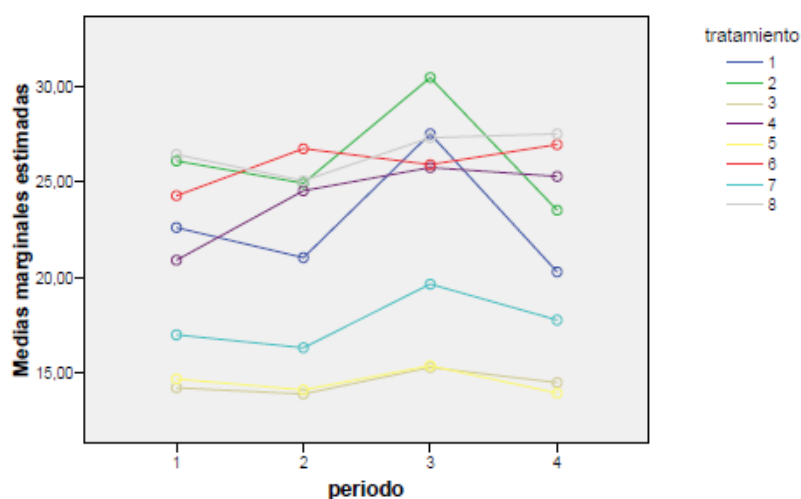
^a Ajuste para comparaciones múltiples: diferencia menos significativa (equivalente a ausencia de ajuste).

Existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos, a excepción del 1 y el 6, y del 2 y el 8, que proporcionan las respuestas medias más altas. Por el contrario, la respuesta media menor es la proporcionada por el tratamiento 3.

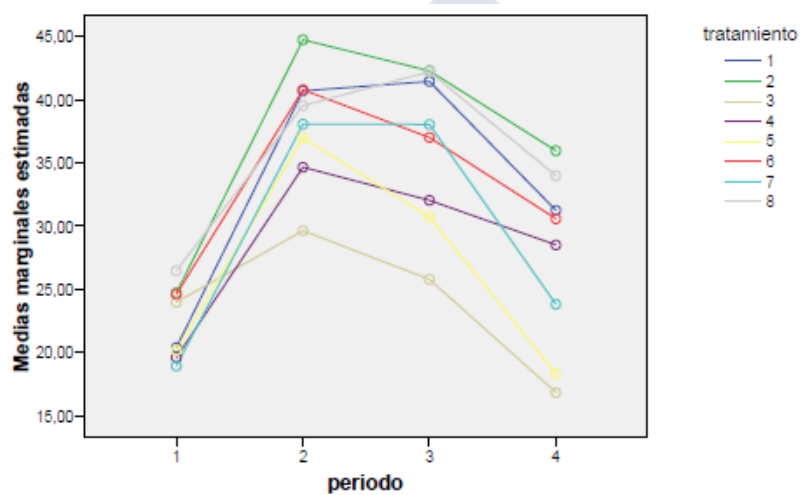
Las **Gráficas E72, E73 y E74** de perfil correspondientes a la combinación **Periodo*Tratamiento*Raza** muestran el comportamiento de los diversos tratamientos.

Gráfica E72

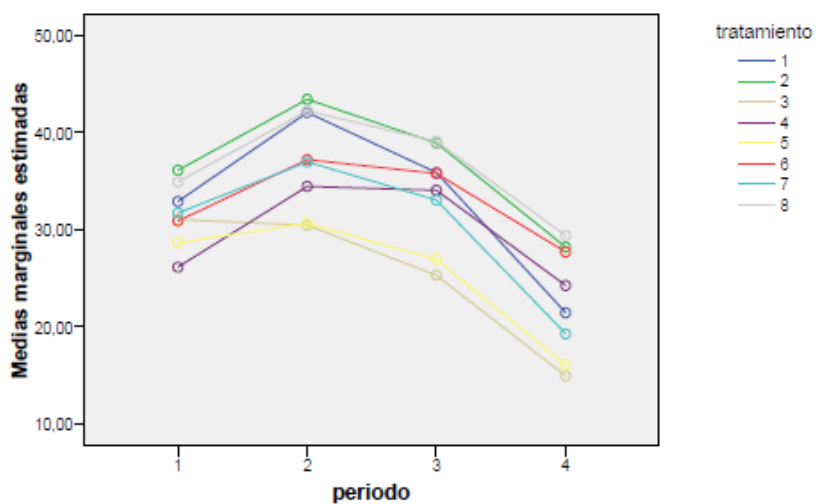
para la raza 1

**Gráfica E73**

para la raza 2

**Gráfica E74**

para la raza 3



2. Periodo

Las **Tablas E61 y E62** ofrecen los resultados para este factor, con las estimaciones para los efectos medios y las comparaciones por pares.

Tabla E61 Estimaciones

periodo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	24,889	1,520	21,796	27,982
2	32,050	1,691	28,610	35,490
3	31,074	1,556	27,908	34,240
4	23,755	,949	21,824	25,685

Tabla E62 Comparaciones por pares

(I) periodo	(J) periodo	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-7,161*	1,048	,000	-9,293	-5,029
	3	-6,185*	1,718	,001	-9,679	-2,691
	4	1,134	1,693	,507	-2,309	4,578
2	1	7,161*	1,048	,000	5,029	9,293
	3	,976	1,550	,533	-2,179	4,130
	4	8,295*	1,585	,000	5,070	11,520
3	1	6,185*	1,718	,001	2,691	9,679
	2	-,976	1,550	,533	-4,130	2,179
	4	7,319*	1,052	,000	5,178	9,460
4	1	-1,134	1,693	,507	-4,578	2,309
	2	-8,295*	1,585	,000	-11,520	-5,070
	3	-7,319*	1,052	,000	-9,460	-5,178

Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

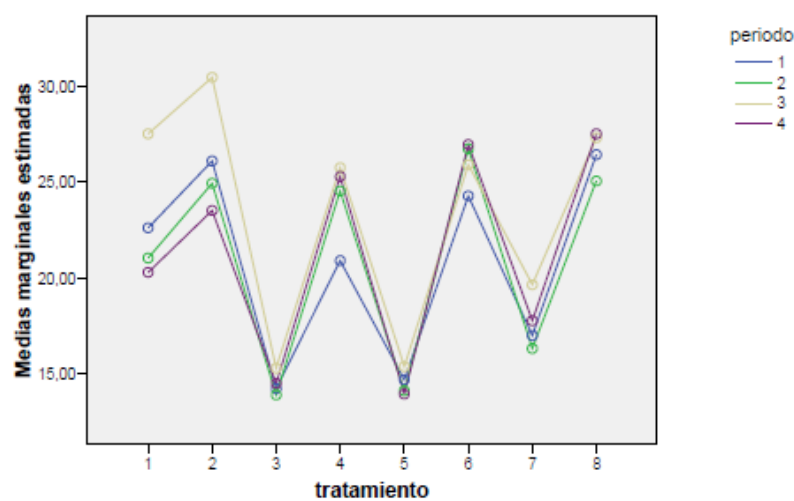
^a Ajuste para comparaciones múltiples: diferencia menos significativa (equivalente a ausencia de ajuste).

Las respuestas medidas en los periodos 1 y 4 (con respuestas medias 24,889 y 23,755, respectivamente) son significativamente distintas de las obtenidas en los periodos 2 y 3 (con respuestas medias respectivas 32,050 y 31,074).

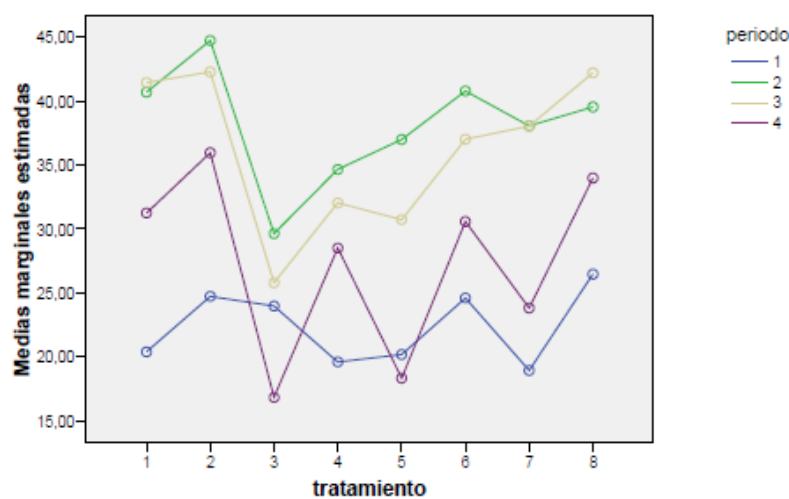
Las **Gráficas E75, E76 y E77** de perfil correspondientes a la combinación **Tratamiento*Periodo*Raza** muestran el comportamiento observado en los cuatro periodos.

Gráfica E75

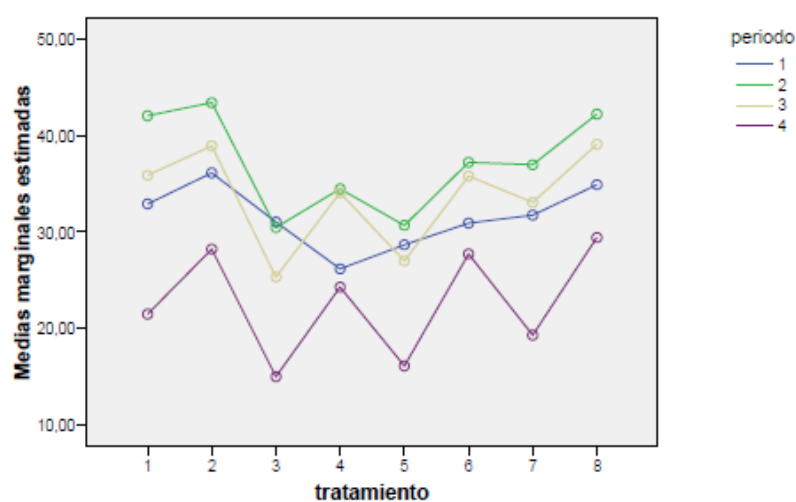
para la raza 1

**Gráfica E76**

para la raza 2

**Gráfica E77**

para la raza 3



3.4 Morfología

La morfología de conjunto del espermatozoide del ganado vacuno se corresponde con el modelo establecido al efecto para definir la organización y constitución de los gametos masculinos en los mamíferos. Cabeza, pieza intermedia, cola y pieza terminal son sus integrantes (Figura 17), aunque un imperceptible estrechamiento entre la cabeza y la pieza intermedia que contiene el centriolo distal se considera a veces como el cuello del espermatozoide. La cabeza contiene el núcleo (pronúcleo) y el acrosoma, ambas rodeadas por sus membranas respectivas; la pieza intermedia contiene la dotación mitocondrial, mientras que el componente fundamental de la cola es el axonema, que no existe en la pieza terminal. El conjunto de la célula está revestido por la membrana plasmática.

Cualquier estructura del espermatozoide puede resultar dañada durante el proceso de la criopreservación si bien en este capítulo se presenta únicamente una selección de imágenes de los defectos morfológicos de los espermatozoides (anormalidades) que son más habituales en el análisis rutinario de la fase de análisis morfológico que se lleva a cabo de manera sistemática en Xenética Fontao (Figuras 18, 19, 20 y 21). De acuerdo con el formulario convencional que se maneja en el centro de referencia, los referidos defectos son clasificados como mayores o menores y de ambos se incluyen ilustraciones.



4. DISCUSIÓN

Lógicamente la presente discusión está focalizada en los efectos del colesterol sobre el esperma del ganado vacuno y se debe contextualizar de manera adecuada. Para ello es imprescindible retomar algunos conceptos y comentarios vertidos en el capítulo de introducción, añadir otros, comparar ambos con los resultados obtenidos y analizar estos últimos aisladamente.

En realidad todos los estudios que se realizan en el campo de la biomedicina tienen como objetivo final contribuir a mejorar la salud de la especie humana y/o su bienestar. Sin embargo en el tema concreto de la IA, que desde luego no es una excepción a la regla, hay connotaciones singulares que merece la pena señalar. La IA en los animales, fundamentalmente en los mamíferos de producción, con independencia de conseguir el logro que se proponía, es decir conseguir un aprovechamiento significativo del semen de los sementales, en el caso particular de la especie bovina –en concreto en el vacuno de leche– ha llegado a constituir una poderosa empresa que mueve anualmente miles de millones de dólares. Así pues, al interés evidente que existe en la IA como técnica reproductiva para la producción animal se añade otro de tipo económico de dimensiones extraordinarias.

Sentadas las bases para la que sería definitiva conservación prolongada del semen, descubrimiento que como se comentaba en páginas anteriores se debió a Polge y cuyas conclusiones se publicaron en un corto intervalo de tiempo en la revista *Nature* (Polge et al., 1949; Polge, 1951), el devenir de la IA experimentó un giro, a la vez que un avance, sustancial. La conservación del semen a bajas temperaturas con la adición de conservantes se aplicó de inmediato al ganado vacuno (Smith & Polge, 1950; Polge & Rowson, 1952; Salisbury et al., 1978), con posterioridad a todas las especies de especial interés veterinario y desde luego a la especie humana (David & Price, 1980; Watson, 1990). Sin embargo los resultados de tal aplicación a un semen de procedencia tan dispar no fueron ni mucho menos homogéneos. Por ese motivo el análisis de la IA comparada, específicamente en cuanto a los hallazgos de Polge se refiere y que fueron acuñados con la denominación de criopreservación, es altamente ilustrativo (Bols et al., 2010; Lemmna, 2013).

Generalmente se acepta que el proceso de la criopreservación representa una interrupción artificial en el progreso que deben experimentar los

espermatozoides después de la eyaculación hacia su propia maduración y consecuente fertilización (Watson, 1995). El semen, que en condiciones naturales está a temperatura corporal, es sometido a un cambio sustancial por efecto del frío y los espermatozoides deben recuperar de nuevo la temperatura de la que proceden para ejercer la función a la que están destinados (Parks, 1997). Es decir, el reiterado y doble sistema de congelación y descongelación del semen. Lamentablemente, sin embargo, los gametos masculinos no son capaces de soportar diferencias extremas de temperatura y son afectados por el ampliamente comentado shock del frío (Watson, 1981; Drobnis et al., 1993; White, 1993) y también por el “shock del calor”, fenómeno al que se le ha dedicado mucha menor atención a pesar de los efectos negativos del mismo en la supervivencia de los espermatozoides (Senger et al., 1976; De Abreu et al., 1979; Bamba & Cran, 1988). Esas son las principales razones por las cuales es imprescindible añadir sustancias al semen para que protejan en la medida de lo posible a los espermatozoides, el descubrimiento señero de Polge con la aplicación del glicerol (Polge et al., 1949; Polge, 1951).

Actualmente no existen dudas acerca de la bondad de la criopreservación como técnica para conservar el semen de las diferentes especies animales pero es una metodología extraordinariamente más compleja de lo que se había pensado después de Polge. El proceso de la criopreservación se inicia con la propia recogida del semen y finaliza con el depósito de la dosis correspondiente en el tracto genital femenino, y durante ese periodo las modificaciones que se pueden introducir en el proceso son prácticamente infinitas en las distintas etapas de dilución y refrigeración, adición de las sustancias seleccionadas (diluyentes, aditivos, crioprotectores) y envasado, congelación, almacenamiento y, finalmente inseminación (Hammerstedt et al., 1990).

Es evidente que la sistemática seguida en todas y cada una de las fases por las que pasa el semen durante el proceso de la criopreservación afecta al resultado final en mayor o menor medida. En la citada secuencia es importante calibrar el tiempo que transcurre entre la recogida del semen y la refrigeración y la manera de realizarlo; así como los tipos de sustancias que se pueden añadir al semen con distintas finalidades (leche o yema de huevo; glicerol, etilenglicol u otros crioprotectores penetrantes); seleccionar los azúcares apropiados (glucosa, galactosa, sacarosa, tetralosa, rafinosa u otros), las sales que se consideren o

los antibióticos indicados (penicilina o estreptomicina); para todos estos casos las condiciones en que se llevan a cabo deben matizarse (buffer utilizado, pH seleccionado, concentración de cada componente); al igual que considerar el tiempo que transcurre entre la refrigeración y la congelación propiamente dicha y la manera de realizar esta última; uniformizar las condiciones de almacenamiento; controlar las condiciones de descongelado y la manera de llevarlo a cabo; por último la inseminación en sí misma cuyas consecuencias serán distintas según sea una inseminación vaginal, transcervical, uterina alta o tubárica (Maxwell, 1986).

Todos y cada uno de esos aspectos son recogidos por la literatura especializada de manera general (Graham, 1978; Jeyendran & Graham, 1980; Saacke, 1983; Bailey et al., 2000; Curry, 2000; Holt, 2000; Medeiros et al., 2002; Bailey et al., 2002; Curry, 2007; Barbas & Mascarenhas, 2009) o especificada por especies (Graham, 1996; Woelders, 1997; Salamon & Maxwell, 2000; Purdy, 2006; Bailey et al., 2008; Aurich, 2012; Rodríguez-Gil et al., 2013). Aunque no son demasiado frecuentes existen asimismo publicaciones que presentan nuevas propuestas relativas al proceder de la criopreservación (Okazaki & Shimada, 2012), en tanto que desde el punto de vista experimental merece la pena resaltar los intentos de aplicar la vitrificación al semen de los animales (Sánchez et al., 2011; Rosato & Iaffaldano, 2012), procedimiento que se encuentra muy avanzado en la especie humana (Isachenko et al., 2011, 2012; Sánchez et al., 2012; Satirapod et al., 2012).

Incluso en el hipotético caso de que se dispusiese de un protocolo ideal para la conservación y posterior utilización del semen mediante criopreservación ese proceder tendría únicamente validez para una especie animal concreta, y aún así habría que considerar variaciones individuales para animales de la misma especie e incluso variaciones parciales para el semen de un mismo semental. Las variaciones entre especies son lógicas que existan debido a las diferencias existentes en los coeficientes de permeabilidad de la membrana celular o conductividad hidráulica y las energías de activación que son propias de los espermatozoides según especies (Watson, 1995; Curry, 2000), lo cual se traduce en una menor o mayor sensibilidad a los cambios de temperatura, que es muy baja por lo general en las especies aviares y también en humanos y sensiblemente más alta en ungulados (Barbas & Mascarenhas, 2009), aunque

dentro del grupo de animales de producción la sensibilidad es mucho mayor en équidos y suidos que en rumiantes. Con respecto a variaciones entre sementales de la misma especie es conocida y muy antigua la clasificación de “good and bad (poor) freezers” para calificar toros cuyo semen resiste mejor el frío que el de otros (Parkinson and Whitfield, 1987), aunque tal variación no es una norma y los resultados obtenidos en el presente estudio no han detectado tal tipo de variaciones. Finalmente en cuanto a las variaciones en un mismo eyaculado son consideradas en el semen del verraco probablemente por la acción de una endotoxina (Okazaki & Shimada, 2012). En los tres supuestos las características morfológicas del conjunto de los espermatozoides justifican ese tipo de modificaciones (ver más adelante).

Uno de los efectos de la criopreservación que suscita gran interés es el que considera que ese proceso provoca o induce la capacitación de los espermatozoides. Aunque en principio el tema de la capacitación espermática por medio de la criopreservación se mantiene con ciertas reservas y es tratado como teoría o hipótesis (Watson, 1995; Bailey et al., 2000; Curry, 2000; Bailey et al., 2002), lo cierto es que hay evidencias que sustentan dicho efecto algunas de ellas citadas ya en el capítulo introducción. Aquellas se completan ahora con la alusión a una excelente exposición conceptual publicada a finales del siglo pasado (Harrison, 1996) así como distintos estudios realizados a nivel molecular (Langlais & Roberts, 1985; Visconti et al., 1998), otros dedicados a la medida de ciertos parámetros in vitro (Wheeler & Seidel, 1986; Pérez et al., 1996; Parrish et al., 1999), y otros relacionados con el colesterol (Cross, 1998; ver más adelante). La consecuencia inmediata de tal capacitación sería la de una menor longevidad de los espermatozoides razón por la cual se insiste tanto en los protocolos convencionales de IA en que ésta será siempre más exitosa cuando su realización sea más próxima al momento de la ovulación, y también que las probabilidades de que los espermatozoides cumplan con su misión serán mayores cuanto más cerca del oviducto se deposite el semen (Watson, 1990; Lemma

, 2013). Es decir, se debería considerar con detenimiento la relación entre capacitación y fertilidad (Gillian et al., 1997).

Todos los especialistas en andrología, humana y veterinaria, están de acuerdo en que la evaluación objetiva de la fertilidad es un asunto

extraordinariamente complejo. Por un lado se precisa disponer de tests de laboratorio específicos y precisos capaces de hacer una evaluación global de las características del semen, y por otro lado se necesita comprobar las condiciones reales del semen, es decir los resultados verdaderos de fecundación –con lo cual hay una participación directa de la hembra– e incluso del posterior desarrollo embrionario. Como en el caso de la criopreservación, en las evaluaciones sobre la fertilidad real del semen son muchos los factores que intervienen y además en algunos de ellos hay derivaciones considerables. No es de extrañar por lo tanto que actualmente la conclusión más lógica a la que se llega es que determinar la fertilidad con los medios actuales sigue siendo una utopía, tal y como se argumentaba hace ya algunos años (Rodríguez-Martínez, 2003).

Se da la circunstancia de que en medicina humana la correlación entre el análisis del semen y su comprobación ulterior no es posible de realizar por razones éticas y biológicas (Amann, 1989), aunque las condiciones sanitarias de la mujer en cuanto a fertilidad se refiere si se pueden establecer. Por el contrario en animales, concretamente en el ganado vacuno, la correlación aludida anteriormente es factible aunque es un proceso largo y por lo tanto costoso, en tanto que definir las condiciones sanitarias de las vacas en relación de fertilidad no es habitual. La diferencia entre ambas situaciones viene dada por la importancia del individuo (humana) frente a la colectividad (animal).

A pesar de lo anterior lo cierto es que también se puede considerar unánime la opinión de que los análisis de laboratorio orientados a definir la presunta calidad del semen son necesarios y sus resultados son de utilidad y de gran valor orientativo (Amann, 2005; Graham & Mocé, 2005; Barth, 2007; Petrunkina et al., 2007; Kastelic & Thundathil, 2008). La Sociedad de Theriogenology (<http://www.therio.org>) establece pautas para lo que debe considerarse como un “satisfactory potential breeder”. En esas pautas se consideran prácticamente todas las características de los espermatozoides en cuanto a motilidad, morfología, análisis de la funcionalidad de las mitocondrias, datos sobre la capacitación espermática así como de la interacción con la zona pelúcida (receptores y ligandos, reacción acrosómica), condiciones estructurales de la membrana plasmática y estado de la cromatina (ADN).

A medida que las garantías sobre la objetividad de las pruebas de laboratorio aumentan –análisis mediante citometría de flujo, sistemas CASA y

SCSA– y se perfeccionen habrá más posibilidades de aproximarse a una respuesta satisfactoria sobre la fertilidad del semen. Otros datos tales como la configuración morfológica externa de los testículos y circunferencia escrotal (Barth, 2007) y sobre la vascularización testicular (Arteaga et al., 2005) también son tenidos en cuenta. De cualquier manera se debe insistir en el hecho de que la valoración de las características del semen tiene que ser global y no parcial aunque las pruebas orientadas a determinar la integridad del ADN son más determinantes que ninguna otra (Irvine et al., 2000; Zini et al., 2001; Peris et al., 2004; Boe-Hansen et al., 2005; Evenson & Wixon, 2006; D'Occhio et al., 2007). Asimismo se destaca que los análisis de laboratorio evalúan dosis de semen y no espermatozoides aislados o independientes; todos los espermatozoides de un mismo eyaculado no son funcionalmente equivalentes y en una misma dosis de semen se pueden encontrar variaciones sustanciales entre células (Amann, 1989).

Históricamente la motilidad y la morfología han sido las características del semen que primero se evaluaron. Aunque entre ambas supuestamente hay una estrecha relación el siguiente comentario está dedicado en exclusividad a los aspectos morfológicos con el fin de aclarar parte de los resultados presentados en este trabajo. Los gametos son células haploides cuya única misión consiste en mezclar sus caracteres genéticos para dar lugar a un nuevo ser; las células que no consiguen ese objetivo degeneran. Sus núcleos (pronúcleos) son los componentes fundamentales de los gametos, y para el caso particular de los espermatozoides se puede decir que los únicos. Sin embargo sorprendentemente los espermatozoides son células morfológicamente complicadas, complejidad que se adquiere en el paso de espermátida a espermatozoide y que es un requisito esencial para su progresión en el tracto genital femenino y para la interacción con la zona pelúcida, corona radiada y membrana del ovocito (Salazar, 2013).

En la práctica de la IA cuando se hacen evaluaciones relativas a la morfología espermática lo que se pretende es conseguir información acerca de los porcentajes de espermatozoides que presentan anomalías en una dosis seminal concreta (Barth & Oko, 1989). Al igual que para otros temas que se vienen considerando la literatura existente relacionada con la morfología normal de los espermatozoides es cuantiosa si bien la publicación de Mortimer y

Menkveld (2001) sobre los espermatozoides humanos es claramente ilustrativa para poner de relieve la extrema complejidad del tema. Los autores citados ven complicado dar respuestas contundentes a la siguiente pregunta: qué es un espermatozoide normal? formulada también en el sentido de: cómo se define un espermatozoide normal? La falta de acuerdo es tan patente que existen diferentes esquemas o modelos de clasificación para considerar la morfología de los espermatozoides del hombre. El denominado sistema David (David et al., 1975) con aplicación exclusiva para Francia, el sistema Dusseldorf (Hofmann et al., 1985) en este caso solo para Alemania, el sistema Tygerberg Strict System (Menkveld et al., 1990), y los sistema de la Organización Mundial de la Salud, WHO 92 (MacLeod, 1970) y WHO 99, este último recoge buena parte de la información contenida en las clasificaciones anteriores, son algunos de los más citados. En realidad los expertos en andrología humana que han participado en los citados programas estiman que los espermatozoides deben de cumplir con una serie de condiciones para ser considerados morfológicamente normales, condiciones que afectan a la cabeza, la pieza intermedia y la cola. Esos mismos expertos reconocen que los humanos son uno de los pocos grupos de especies que exhiben una extrema heterogeneidad o pleiomorfismo en la morfología de sus espermatozoides (Mortimer & Menkveld, 2001).

Afortunadamente sin embargo en los mamíferos de mayor interés veterinario, concretamente en el ganado vacuno, las diferencias aludidas no parecen ser tan abismales (Hancock, 1952; Boersma et al., 2001). No obstante, en el momento de establecer correlaciones directas entre las evaluaciones morfológicas de los espermatozoides, que incluyen la presencia de anormalidades, y la viabilidad del semen se recomienda prudencia porque hay demasiados factores a considerar (Söderquist et al., 1991; Johnson, 1997; Al-Makhzoomi et al., 2008). Por otra parte el número de variables que se pueden manejar para encuadrar espermatozoides anormales es muy elevado ya que en realidad cualquier parte de la estructura de la célula es susceptible de presentar defectos (Barth & Oko, 1989). Los tipos de anormalidades también han sido estudiados desde la perspectiva de su supuesta incidencia en la viabilidad, y en ese sentido se estima que determinadas anormalidades morfológicas de los espermatozoides se pueden compensar con incrementos en la dosis seminales, pero otras no lo son (Saacke, 2008). Lo cierto es que, al igual que sucede en

humanos, se estima que también en bóvidos espermatozoides anormales morfológicamente tienen una alta probabilidad de presentar anomalías cromosómicas (Lee et al., 1996; Kishikawa et al., 1999).

Como ocurre en el resto de pruebas de laboratorio, los tests morfológicos son subjetivos y por lo tanto tienen un valor relativo, aunque desde luego pueden ser considerados interesantes en el momento de hacer predicciones. Estudios exhaustivos sobre la morfología de los espermatozoides están fundamentalmente indicados en casos puntuales en los que se persiga la definición de una característica concreta, y son muy valiosos cuando se aplican a células aisladas o en experimentación. Los párrafos anteriores deben entenderse como argumentos suficientes para justificar que en el presente trabajo se decidiese presentar el apartado de resultados morfológicos de acuerdo con el análisis rutinario que se realiza en Xenética-Fontao y que está en la línea pregonada por algunos autores en el sentido de que con esa sistemática se pueden ofrecer a los veterinarios clínicos orientaciones sencillas de interpretar sobre la supuesta calidad del semen de los toros (Menon et al., 2011). El tipo de anomalías seleccionadas son las consideradas como más frecuentes y, en líneas generales, coinciden con las señaladas tradicionalmente como tales (Barth & Oko, 1989). Se debe hacer constar igualmente que, aun no siendo habitual, un mismo espermatozoide puede presentar varias anomalías simultáneamente. En cuanto a la repercusión que cada tipo de anomalía pueda tener sobre la funcionalidad del espermatozoide existen dificultades para hacer evaluaciones rigurosas. No obstante, la diferenciación entre defectos mayores y menores marca una pauta que en líneas generales es aceptada como orientativa. En los análisis de las anomalías de los espermatozoides es preciso igualmente tener en cuenta el lugar/momento en el que se presentan las mismas: durante la espermatogénesis, nivel del tracto genital masculino, nivel del tracto genital femenino u otras alternativas (Johnson, 1997; Al-Makhzoomi et al., 2008; Saacke, 2008).

Entre las innumerables alternativas que existen para confeccionar protocolos de crioconservación del semen (cualesquiera que sean deben ser evaluadas y contrastadas) aquella encaminada a modificar el contenido en colesterol de la membrana plásmática de los espermatozoides está siendo utilizada en un amplio y variado número de especies. Desde el ratón (Choi &

Toyoda, 1998) al elefante (Kiso et al., 2012) pasando por otros mamíferos tales como el conejo (Serin et al., 2011), los monos (Alvarez et al., 2006), y los humanos (Lim et al., 2008), aunque son los mamíferos de producción los que mayor atención han acaparado por parte de los investigadores. Tal es el caso de los équidos (Combes et al., 2000; Zhan et al., 2002; Moore et al., 2005; Oliveira et al., 2010; Spizziri et al., 2010; Hartwig et al., 2012), los suidos (Galantino-Horner et al., 2006; Blanch et al., 2012; Tomás et al., 2012; 2013), los pequeños rumiantes (Iborra et al., 2000; De Graaf et al., 2007; Amidi et al., 2010; Mocé et al., 2010b; Silva et al., 2012; Konyali et al., 2013), y por supuesto los bóvidos (Parks et al., 1981; Ehrenwald et al., 1988; Awad & Graham, 2002; Purdy & Graham, 2004a; 2004b; Mocé & Graham, 2006; Amorin et al., 2009; Moraes et al., 2010; Farshad et al., 2011).

En su momento se pudo determinar que el semen de ciertas especies animales resistía de manera diferente el frío, el cambio brusco de temperaturas, y que esas diferencias estaban en relación directa con los niveles de ácidos grasos poli-insaturados y colesterol (Watson, 1981). Es decir que el modelo del mosaico fluido definido para las membranas celulares (Singer & Nicolson, 1972) tiene perfecta validez para los espermatozoides pero la proporción de sus distintos componentes –incluido el colesterol– es variable según circunstancias y, desde luego, según especies. Los efectos de esas variaciones sobre la funcionalidad de la membrana celular son tratados desde distintos puntos de vista (Amann & Pickett, 1987; Crockett, 1998; De Meyer & Smit, 2009). Afortunadamente existen en la literatura especializada excelentes revisiones sobre los efectos del colesterol (Darin-Bennett & White, 1977; Christian et al., 1997; Visconti et al., 1999; Mocé et al., 2010a), y de todos ellos destaca el de la facultad de estabilizar las membranas a bajas temperaturas. Por otro lado, y al hilo de lo ya comentado en la introducción, se insiste en que la fórmula ideal para modificar al alza el contenido de colesterol en las membranas de los gametos masculinos se realiza por medio del uso de las ciclodextrinas (Dobziuk, 2006). Resulta indudable que a medida que se progrese en el conocimiento de las características de la membrana de los espermatozoides (Zidovetzki & Levitan, 2007; Eirín-López & Ausió, 2009; Brebis & Gadella, 2010; Le Guillou et al., 2013) habrá más pautas para profundizar en el manejo del colesterol y de otras moléculas durante el proceso de la criopreservación.

Nuestros resultados ponen claramente de manifiesto el efecto beneficioso que ejerce el colesterol/ciclodextrinas cuando se añade al semen de toros en el proceso de la criopreservación. Esos datos están en consonancia con estudios previos y se considera que de las publicaciones dedicadas al efecto del colesterol en el semen de los bóvidos ciertas referencias del grupo de Graham (Purdy & Graham, 2004a, b; Mocé & Graham, 2006) son relevantes, y por lo tanto se podrían tomar como modelo. Sin embargo existen algunos inconvenientes para establecer comparaciones exhaustivas entre trabajos previos y nuestros hallazgos. Tales dificultades están en relación directa con cuestiones procedimentales ya que, de la misma manera que los protocolos a desarrollar en el proceso de la criopreservación son prácticamente infinitos debido a la cantidad de factores que entran en juego, la metodología relativa a la adición de colesterol admite infinidad de alternativas. Desde la preparación de las ciclodextrinas hasta la mediación final de los efectos ocasionados pasando por todas y cada una de las fases que intervienen en el proceso –descritas pormenorizadamente en el correspondiente capítulo de material y métodos– hace muy difícil, si no imposible, repetir con exactitud los experimentos programados. En esas circunstancias la deseada e incluso exigible repetitibilidad de los experimentos es cuestionable.

A pesar de lo anterior se hace necesario contrastar los resultados obtenidos con otra información ya existente. Así por ejemplo, en cuanto al análisis de la viabilidad se refiere, el efecto del colesterol utilizado entre un rango de 0.75mgr y 7,5mgr los valores de 1.5mgr, 3mgr y 4.5mgr se han mostrado como los más beneficiosos con porcentajes del 55, 60 y 57 respectivamente en relación al 46% del control; por debajo de 1,5mgr y por encima de 4,5mgr no se observaba mejoría (Purdy & Graham, 2004a). Por otro lado, análisis diferentes demuestran un sensiblemente mejor comportamiento de la adición del colesterol cuando los tratamientos se hacen a dosis de 2mgr (61%) que a dosis de 4mgr (48%), en ambos casos con efecto favorable respecto al control, 38% (Mocé & Graham, 2006). En el experimento diseñado por nosotros para definir la viabilidad de los espermatozoides los tratamientos se hicieron con dosis inferiores –0.5mgr, 1mgr y 2mgr– pero en todas las circunstancias los efectos fueron positivos o, lo que es lo mismo, se observó una mejoría. Bien es verdad que las diferencias porcentuales entre los tratamientos con respecto al control son menores que las obtenidas por los autores recién citados, la más alta

correspondiente a los 2mgr. Como se acaba de comentar la justificación entre tales diferencias –resultados previos y los propios– son difíciles de establecer con rigor, aunque es obvio que un distinto protocolo conduce a resultados dispares, si bien existe bastante similitud entre el procedimiento seguido por los autores recién citados y el seguido por nosotros. La utilización de muestras de semen sin diluir en nuestro experimento y el empleo de un diluyente casero son factores a tener en cuenta, así como que los sementales donantes de semen fuesen toros probados, observación válida para el resto de casos que se comentan a continuación y que, probablemente, pudiera justificar de alguna manera ciertas diferencias porcentuales. Una observación adicional es pertinente en el sentido de que al momento de hacer la evaluación sobre la viabilidad se puede abordar simultáneamente la motilidad espermática, circunstancia que no ha sido considerada en nuestro experimento, pero si se incluyó una aproximación al análisis de la termo-resistencia.

La dificultad para contrastar resultados se hace extrema cuando los protocolos difieren de manera sustancial. En ese sentido un buen ejemplo lo representa la valoración de la reacción acrosómica cuando el semen es tratado con colesterol para el proceso de la criopreservación según una de las publicaciones ya citadas (Purdy & Graham, 2004b) y nuestro trabajo. Aunque en principio el objetivo es el mismo en ambos casos la metodología es dispar, entre otros muchos motivos porque nosotros seguimos un procedimiento derivado del protocolo seguido en el laboratorio de FIV de Xenética Fontao. Tal proceder consiste en someter a las dosis seminales a un gradiente de densidades que elimina los espermatozoides inmóviles y, por lo tanto, es equivalente a hacer una selección previa del material a examinar. Únicamente por esa circunstancia es plausible justificar diferencias entre aquellos resultados que indican una similitud entre las muestras tratadas y las no tratadas (Purdy & Graham, 2004b) y los que muestran variaciones según sean los casos, como se ha detectado en nuestro estudio. De la misma manera que cuando se valora la viabilidad se pueden abordar otros análisis, al momento de explorar la reacción acrosómica también es posible aprovechar para hacer determinaciones distintas como por ejemplo la medición de los niveles de calcio orientado a definir la capacitación de los espermatozoides, que no ha sido considerada en nuestro estudio.

Ya que se entiende que no tendría sentido seguir insistiendo en establecer

comparaciones entre estudios regidos por diferente protocolo se aborda a continuación exclusivamente la interpretación de los resultados obtenidos en la presente memoria, basados preferentemente en la información facilitada por el estudio estadístico.

Experimento 1: test de viabilidad y termo-resistencia. De los cuatro factores considerados el factor raza tiene un valor de significación de 0.644 y por lo tanto muy lejos de ser estadísticamente significativo; el cuadro de estimaciones demuestra asimismo como las medias están muy próximas entre sí, con los intervalos de confianza superpuestos. La estadística confirma la lógica en cuanto al factor tiempo se refiere ya que con el paso del tiempo hay un descenso en las respuestas. Por lo que respecta al factor tratamiento la respuesta a los tres tratamientos es significativamente distinta entre sí y también con respecto al control o tratamiento 1, resultados que se encuadran dentro de lo que se esperaba. Un aspecto de interés sobresaliente viene marcado por el análisis de la interacción entre los factores tratamiento/tiempo que pone de relieve con claridad la proporcionalidad entre mayor dosis mejor termo-resistencia. Con cualquier dosis los tiempos 1 y 2 no son significativos entre ellos pero sí lo son con el tiempo 3. Finalmente del factor periodo se podría inferir que en los meses más fríos del año, diciembre y enero, hay una menor respuesta que en los restantes. No obstante, la interpretación del efecto del factor periodo y también del factor raza necesita un comentario global independiente (ver más adelante).

Experimento 2: test de la fragmentación de la cromatina o fragmentación del ADN. A pesar de que el sistema SCSA (Evenson et al., 1980) tenga una gran implantación en los centros especializados y de que sus cualidades son generalmente bien aceptadas (Evenson & Jost, 2000; Evenson & Wixon, 2006; Sakkas & Alvarez, 2010), lo cierto es que esta prueba de laboratorio tiene algunos aspectos que pueden resultar controvertidos (Bungum et al., 2004, 2007). A ese respecto son muchos los factores que pueden tomarse en consideración entre los que merece la pena mencionar los siguientes: si la fragmentación afecta al ADN del núcleo, de las mitocondrias o de ambos; la manera de afectar la fragmentación a la cadena de ADN, simple o doble; la extensión individual –en un mismo espermatozoide– de la susodicha fragmentación; la capacidad funcional (fertilizante) del espermatozoide con fragmentación de ADN y la propia capacidad del ovocito para reparar el daño

genómico o no; los lugares en los cuales es susceptible de producirse la fragmentación, que puede ocurrir durante la espermatogénesis, durante la espermiogénesis, durante la emigración de los espermatozoides bien en los tubos seminíferos o en la cola del epidídimo; las posibles causas de la aparición de la fragmentación, por ejemplo a consecuencia de la indebida activación de determinadas proteínas espermáticas, efectos secundarios de ciertos tratamientos agresivos, o por la acción de productos tóxicos existentes en el medio ambiente (Sakkas & Alvarez, 2010). Con los antecedentes previos se entenderá la dificultad existente para hacer una interpretación razonable de los resultados obtenidos. Cuando se observan los resultados, en cuanto al análisis del porcentaje de células al margen de la población principal se refiere, se detecta que el único factor que muestra niveles de significación es el tratamiento, con medias muy similares entre sí y con intervalos de confianza comunes, pero sin que se pueda llegar a establecer ninguna pauta razonable. Por el contrario, cuando los resultados que se manejan son los correspondientes a la media de todas las células analizadas los niveles de significación corresponden a los factores raza y periodo (ver más adelante), pero no lo son para el factor tratamiento. No obstante lo anterior el test de la fragmentación de la cromatina se considera de utilidad ya que se estima que una muestra de semen con el 30% de espermatozoides que presenten su ADN fragmentado tiene un claro indicio de infertilidad (Evenson & Jost, 2000; Evenson & Wixon, 2006).

Experimento 3: test de la reacción acrosómica. Tanto el factor raza como el factor periodo muestran respuestas dispares según sea el tipo de células que se analizan, por lo que esa disparidad se comenta más adelante para el conjunto de los experimentos. En cuanto al factor tratamiento se refiere se definen diferencias significativas para los cuatro casos analizados, con la existencia de una correspondencia clara y lógica cuando el objetivo implica espermatozoides vivos con acrosoma reactivo y en otro con acrosoma íntegro ya sean inducidos con ionóforo de calcio o no: hay inversión de los porcentajes en un caso con respecto al otro. Una pauta similar ocurre en cuanto a los espermatozoides muertos con acrosoma reactivo e íntegro pero solo para el caso de las muestras sin inducir. Para los casos en los que hay inducción con ionóforo de calcio no es posible establecer ningún tipo de interpretación razonable excepto si se contempla la posibilidad de que la población de células del cuadrante inferior

derecho (espermatozoides vivos con acrosoma íntegro) se desplace a los otros cuadrantes de manera aleatoria. De cualquier manera habría que hacer hincapié en el hecho del poco sentido biológico que en principio tendría analizar células muertas que, por otro lado, serían susceptibles de mostrar un comportamiento completamente errático.

Se ha considerado pertinente dedicar un breve apartado a la interpretación de las variaciones que muestran los factores raza y periodo para el conjunto de los experimentos diseñados. Para el factor raza, en los siete casos analizados se observan variaciones lo que viene a demostrar que el semen de cada uno de los sementales, agrupados de cuatro en cuatro por razas, tiene una respuesta distinta, como a priori se suponía debía de ocurrir. El estudio estadístico pone de manifiesto, a través de las tablas correspondientes de “pruebas de los efectos inter-sujetos” y de “estimaciones”, que existen dos niveles de significación para la raza frisona y otros dos para la raza limusina, información que con las reservas necesarias se podrían tomar en consideración en futuros trabajos. De la misma manera, para el factor periodo, en los siete casos analizados se observan variaciones lo que viene a demostrar que el semen de cada uno de los sementales tiene una respuesta distinta según fuese la época de recogida, como a priori se suponía debía de ocurrir. El estudio estadístico pone de manifiesto, a través de las tablas correspondientes de “pruebas de los efectos inter-sujetos” y de “estimaciones”, que excepto en un caso todos los demás presentan niveles de significación con una tendencia a la proximidad entre los periodos 1 y 4 con respecto a los periodos 2 y 3. De acuerdo con esa estimación podría sugerirse que la temperatura ambiente influiría en las respuestas obtenidas en los distintos experimentos.



5. CONCLUSIONES

El proceso de criopreservación del semen de ganado vacuno admite alternativas de procedimiento ilimitadas, una de las cuales es la adición de colesterol cargado con ciclodextrinas, que a su vez tiene un rango de variantes muy amplio. La variabilidad y diversidad son dos características destacadas metodológicas.

En relación con el punto anterior los protocolos llevados a cabo en los experimentos deben ser extraordinariamente precisos puesto que la repetitibilidad de los ensayos es difícil de conseguir. Por esa razón la comparación de resultados entre distintos estudios debe ser tomada con cautela. En ese sentido, el hecho de que los sementales utilizados fuesen toros probados en vida productiva estabulados en un centro especializado es un punto sobresaliente, cuya repercusión en los resultados finales es complicado de evaluar pero se supone que tiene incidencia. Otros detalles diferenciables, como el que las muestras de semen estuviesen sin diluir y que la criopreservación se realizase en un congelador programable, son asimismo factores condicionantes.

De acuerdo con el diseño de los experimentos y el protocolo desarrollado la adición de colesterol cargado con ciclodextrinas al semen de los doce sementales escogidos tuvo un beneficioso efecto en el proceso de la criopreservación del semen. Para cualquiera de los tratamientos empleados, la viabilidad de los espermatozoides tuvo una sensible mejoría en comparación con los datos control. De igual manera, la termo-resistencia celular mejoró con la adición de colesterol/ciclodextrinas.

Cualquier estructura de las que forman parte de la organización general del espermatozoide es susceptible de alterarse negativamente durante el proceso de la criopreservación. No obstante, la presentación de anomalías espermáticas es habitual encontrarlas en el semen fresco, razón por la cual es recomendable realizar evaluaciones morfológicas previas al proceso de la criopreservación. Las muestras con espermatozoides anormales podrán ser utilizadas en la inseminación artificial de acuerdo con el porcentaje de células afectadas y con el tipo de anomalía que presenten. En ciertos casos, determinados tipos de muestras con alteraciones morfológicas pueden ser compensadas con ampliación de las dosis.

Una de las alteraciones morfológicas de mayor interés la representa la fragmentación de la cromatina ya que, en este caso, la parte afectada es la parte noble de la célula, es decir su ácido desoxirribonucleico. Tales modificaciones se determinaron con el sistema SCSA, con resultados objetivos pero de escasa significación.

Igualmente parece pertinente incluir entre las alteraciones morfológicas de los espermatozoides el estado de su acrosoma. En todos los supuestos, las muestras de semen tratadas con colesterol/ciclodextrinas se sometieron a un proceso de selección previo mediante el gradiente de densidades. De las ocho modalidades de tratamiento establecidas, en seis de ellas hubo una relación de proporcionalidad directa por pares: espermatozoides vivos con acrosoma reactivo e íntegro, sin inducción y con inducción, y espermatozoides muertos con acrosoma reactivo e íntegro sin inducción. En las dos modalidades restantes, espermatozoides muertos con acrosoma reactivo e íntegro con inducción la respuesta es calificada como incontrolada. Una posible justificación pudiera estar en que el desplazamiento de los espermatozoides del cuadrante vivos con acrosoma reactivo es aleatoria.

La mejora de las condiciones del semen durante el proceso de la criopreservación mediante la adición de colesterol/ciclodextrinas debe seguir explorándose puesto que son muchas las posibilidades que se suponen pueden contribuir a un perfeccionamiento de la técnica.



6. BIBLIOGRAFÍA

Aires VA, Hinsch K, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60, 269-279.

Aitken RJ, Baker MA. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fert Develop* 16, 581-588.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2011. Introducción a la biología celular. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 39-77; 363-381.

Al-Makhzoomi A, Lundeheim N, Haard M, Rodríguez-Martínez. 2008. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology* 70, 682-691.

Almquist J. 1975. Effect of sperm numbers on fertility of frozen bull spermatozoa in skim milk diluent. *J Dairy Sci* 58, 420-422.

Almquist J, Glantz P, Shaffers H. 1949. The effect of a combination of penicillin and streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen. *J Dairy Sci* 32, 183-190.

Alvarez A, Serres C, Torres P, Crespo F, Mateos E, Gómez-Cuétaral C. 2006. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 94, 89-91.

Amann RP. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* 10, 89-98.

Amann RP. 2005. Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. *Theriogenology* 63, 698-715.

Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci* 7, 145-173.

Amann RP, Seidel G, Mortimer R. 2000. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology* 54, 1499-1515.

Amidi F, Farshad A, Khor AK. 2010. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. *Cryobiology* 61, 94-99.

Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61, 895-907.

Amorim E, Graham JK, Spizziri B, Meyers M, Torres C. 2009. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 58, 210-214.

Arteaga AA, Barth AD, Brito LF. 2005. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology* 64, 408-415.

Ashrafi I, Kohram H, Ardabili FF. 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 139, 25-30.

Aurich JE. 2012. Artificial insemination in horses. More than a century of practice and research. *J Equine Vet Sci* 32, 458-463.

Awad M. 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 123, 157-162.

Awad M, Graham JK. 2002. Effect of adding cholesterol to bovine spermatozoa on motility parameters and cell viability after cryopreservation. *Cryobiology* 45, 256-257.

Bailey JL, Bilodeau J, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 21, 1-7.

Bailey JL, Morrier A, Cormier N. 2002. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *Can J Anim Sci* 83, 393-401.

Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Brèque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Hommer HL. 2008. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 70, 1251-1259.

Bamba K, Cran DG. 1988. Effect of rapid warming of bull and rabbit semen. *J. Reprod. Fertil.* 82, 501-507.

Bansal AK, Bilaspuri G. 2010. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2011, 1-7.

Barbas J, Mascarenhas R. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10, 49-62.

Barr H. 1975. Influence of estrus detection on days open in dairy herds. *J Dairy Sci* 58, 246-247.

Barth AD. 2007. Evaluation of potential breeding soundness of the bull. In, Youngquist RS, Threlfall WR (eds), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders Elsevier, Philadelphia, pp. 228-240.

Barth AD, Oko R. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa University Press, Ames.

Baruselli P, Sales J, Sala R, Vieira L, Filho MS. 2012. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim Reprod* 9, 139-152.

Beatty R, Stewart D, Spooner R, Hancock J. 1976. Evaluation by the heterospermic insemination technique of the differential effect of freezing at -196°C on fertility of individual bull semen. *J Reprod Fertil* 47, 377-379.

Beconi M, Francia C, Mora N, Affranchino M. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40, 841-851.

Bergeron A, Crête M, Brindle Y, Manjunath P. 2004. Low density lipoprotein fraction from hens egg yolk decreases the binding of the mayor proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipids efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 70, 708-717.

Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 55, 282-288.

Blanch E, Tomás C, Graham JK, Mocé E. 2012. Response of boar sperm to the treatment with cholesterol-loaded cyclodextrins added prior to cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 47, 959-964.

Boe-Hansen GB, Ersbøll AK, Greve T, Christensen P. 2005. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 63, 2006-2019.

Boersma A, Rasshofer R, Stolla R. 2001. Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. *Reprod Domest Anim* 36, 222-229.

Bols PE, Langbeen A, Verberckmoes S, Leroy JL. 2010. Artificial insemination in livestock production: the Vet's per-spective. *F V & V IN ObGyn, Monograph*, 6-12.

Breitbart H, Spungin B. 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 3, 195-202.

Brevis IA, Gadella BM. 2010. Sperm surface proteomics: from protein list to biological function. *Mol Hum Reprod* 16, 68-79.

Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. 2004. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 19, 1401-1408.

Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. 2007. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 22, 174-179.

Campbell R, Hancock J, Rothschild L. 1953. Counting live and dead bull spermatozoa. *J Exp Biol* 30, 44-49.

Campbell R, Dott H, Glover T. 1956. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J Agric Sci* 48, 1-8.

Cassou R. 1964. La méthode des paillettes en plastique adaptée a la généralisation de la congélation. In, *Proc 5th Int Congr Anim Reprod. Trento, Italy.* 4, 540-546.

Chen Y, Foote R, Brockett C. 1993. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 30, 423-431.

Choi YH, Toyoda Y. 1998. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. *Biol Reprod* 59, 1328-1333.

Christensen P, Boelling D, Pedersen KM, Korsgaard IR, Jensen J. 2005. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. *J Androl* 26, 98-106.

Christian A, Haynes M, Phillips M, Rothblat G. 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 38, 2264-2272.

Combes GB, Varner DD, Schroeder F, Burghardt RC, Blanchard TL. 2000. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil* 56, 127-132.

Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 74, 424-435.

Cormier N, Sirard M, Bailey JL. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18, 461-468.

Crockett EL. 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am Zool* 38, 291-304.

Cross NL. 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59, 7-11.

Cross NL. 1999. Effect of methyl- β -cyclodextrin on the acrosomal responsiveness of human sperm. *Mol Reprod Dev* 53, 92-98.

Cross NL, Meizel S. 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 41, 635-641.

Curry MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod* 5, 46-52.

Curry MR. 2007. Cryopreservation of mammalian semen. *Methods Mol Biol* 368, 303-311.

D'Occhio M, Hengstberger K, Johnston S. 2007. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Anim Reprod Sci* 101, 1-17.

Darin-Bennett A, White I. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466-470.

David G, Price WS (eds.) 1980. Human artificial insemination and semen preservation. Plenum Press, New York.

David G, Bisson JP, Czyglik F, Jouannet P, Gernigon C. 1975. Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. 1) Propositions pour un système de classification. *J Gyn Obstet Biol Reprod* 4, 17-36.

Davis RO, Katz D. 1993. Operational standards for CASA instruments. *J Androl* 14, 385-394.

Davis RO, Siemers RJ. 1995. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fert Develop* 7, 857-869.

De Abreu RM, Berndtson WE, Smith RL, Pickett BW. 1979. Effect of post-thaw warming on viability of bovine spermatozoa thawed at different rates in French straws. *Dairy Sci* 62, 1449-1454.

De Graaf S, Evans G, Gillan L, Guerra M, Maxwell W, O'Brien J. 2007. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology* 67, 217-227.

De Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3, 175-194.

De Meyer F, Smit B. 2009. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 3654-3658.

Den Daas N. 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci* 28, 87-94.

Dittrich W, Göhde W. 1969. Impulsfluorometrie bei einzelnzellen in suspensionen. *Z Naturforschung* 24b, 360-361.

Dobziuk H. 2006. Molecules with holes cyclodextrins. In: Dodziuk H (ed.), *Cyclodextrins and their complexes*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co, Weinheim, pp. 1-30.

Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 265, 432-437.

Ehrenwald E, Parks JE, Foote RH. 1988. Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Res* 20, 145-157.

Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. 1990. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 25, 195-204.

Eirín-López JM, Ausió J. 2009. Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *Bioessays* 31, 1062-1070.

Evenson DP. 2013. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol Biol* 927, 147-164.

Evenson DP, Jost LK. 2000. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Method Cell Sci* 22, 169-189.

Evenson DP, Wixon R. 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 65, 979-991.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131-1133.

Farshad A, Amidi F, Koohi Khor A, Rashidi A. 2011. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin in presence and absence of egg yolk during freezing step on quality of Markhoz bucks spermatozoa. *Asian Australas J Anim Sci* 24, 181-189.

Felipe-Pérez YE, Valencia J, Juárez-Mosqueda MDL, Pescador N, Roa-Espitia AL, Hernández-González EO. 2012. Cytoskeletal proteins F-actin and β -dystrobrein are altered by the cryopreservation process in bull sperm. *Cryobiology* 64, 103-109.

Foote RH. 1970. Fertility of bull semen at high extension rates in Tris-buffered extenders. *J Dairy Sci* 53, 1475-1477.

Foote RH. 1975. Estrus detection and estrus detection aids. *J Dairy Sci* 58, 248-256.

Foote RH. 2002. The history of artificial insemination. Selected notes and notables. *J Anim Sci* 80, 1-10.

Foote RH, Bratton R. 1949. The fertility of bovine semen cooled with and without the addition of citrate-sulfanilamide-yolk extender. *J Dairy Sci* 32, 856-861.

Foote RH, Bratton R. 1950. The fertility of bovine semen in extenders containing sulfanilamide, penicillin, streptomycin and polymyxin. *J Dairy Sci* 33, 544-547.

Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 71, 13-23.

Forero-Gonzalez R, Celeghini E, Raphael C, Andrade A, Bressan F, Arruda R. 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* 44, 154-159

Fulwyler MJ. 1965. Electronic separation of biological cells by volume. *Science* 150, 910-911.

Funk D. 2006. Major advances in globalization and consolidation of the artificial insemination industry. *J Dairy Sci* 89, 1362-1368.

Galantino-Homer HL, Zeng W, Megee SO, Dallmeyer M, Voelkl D, Dobrinski I. 2006. Effects of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Mol Reprod Dev* 73, 638-650.

Garner DL, Johnson LA. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 53, 276-284.

Garner DL, Johnson L, Yue S, Roth B, Haugland R. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl* 15, 620-629.

Garner DL, Thomas CA, Allen CH. 1997a. Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *J Androl* 18, 324-331.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Dejarnette J, Marshall CE. 1997b. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 57, 1401-1406.

Gillan L, Evans G, Maxwell WM. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9, 481-487.

Gillan L, Evans G, Maxwell W. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63, 445-457.

Gogol P, Bochenek M, Smorąg Z. 2002. Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reprod Domest Anim* 37, 92-95.

Graham EF. 1978. Fundamentals of the preservation of spermatozoa. In: Rinfret AP, Petricciani JC (eds), *The integrity of frozen spermatozoa*. Proc Conf Natl Acad Sci, Washington, pp 4-44.

Graham JK. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract* 12, 131-147.

Graham JK. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 68, 239-247.

Graham JK, Mocé E. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64, 492-504.

Gravance C, Vishwanath R, Pitt C, Garner D, Casey P. 1998. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J Androl* 19, 704-709.

Grunewald S, Baumann T, Paasch U, Glander HJ. 2006. Capacitation and acrosome reaction in nonapoptotic human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* 1090, 138-146.

Guthrie H, Liu J, Critser J. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 67, 1811-1816.

Hackett A, Macpherson J. 1965. Some staining procedures for spermatozoa. *Can Vet J* 6, 55-62.

Hafs H, Manns J, Drew B. 1975. Onset of estrus and fertility of dairy heifers and suckled beef cows treated with prostaglandin F2a. *Anim Prod* 21, 13-20.

Hallap T, Nagy S, Håård M, Jaakma Ü, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2005. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. *Theriogenology* 63, 1752-1763.

Hammerstedt R, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11, 73-88.

Hancock J. 1952. The morphology of bull spermatozoa. *J Exp Biol* 29, 445-453.

Harrison RA. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8, 581-594.

Harrison RA, Vickers SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 88, 343-352.

Hartwig F, Lisboa F, Monteiro G, Maziero R, Alvarenga M, Papa F, Dell'aqua J. 2012. 22 effect of cholesterol addition to equine sperm membrane on fertility. *Reprod Fert Develop* 25, 158.

Heape W. 1897. The artificial insemination of mammals and subsequent possible fertilisation or impregnation of their ova. *P R Soc London* 61, 52-63.

Hofmann N, Freundl G, Florack M. 1985. Die Formstörungen der spermatozoon im sperma und zervikalschleim als spiegel testikulärer erkrankungen. *Gynäkologe* 18, 189-192.

Holt W. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62, 3-22.

Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl* 13, 406-419.

Hu JH, Li QW, Chen YL, Jiang ZL, Jia Y, Wang LQ, Ou BB. 2009. Effects of addition of vitamin B12 to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen. *Turk J Vet Anim Sci* 33, 379-384.

Hu JH, Tian W, Zhao X, Zan L, Xin Y, Li Q. 2011. The cryoprotective effects of vitamin B12 supplementation on bovine semen quality. *Reprod Domest Anim* 46, 66-73

Iborra A, Companyó M, Martínez P, Morros A. 2000. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biol Reprod* 62, 378-383.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 21, 33-44.

Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Mallmann P, Rahimi G, Sterzik K, Sanchez R, Risopatron J, Damjanoski I, Isachenko E. 2011. Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (up to 0.5 mL) volume: a novel technology. *Clin Lab* 57, 643-650.

Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, Sanchez R, Risopatron J, Damjanoski I, Isachenko E. 2012. Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. *J Androl* 33, 462-468.

Ivanoff E. 1922. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *J Agri Sci* 12, 244-256.

Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 55, 947-961.

Jeyendran R, Graham EF. 1980. An evaluation of cryoprotective compounds on bovine spermatozoa. *Cryobiology* 17, 458-464.

John Morris G, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. 2012. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology* 64, 71-80.

Johnson WH. 1997. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. *Vet Clin N Am-Food A* 13, 255-270.

Kastelic J, Thundathil J. 2008. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim* 43, 368-373.

Kishikawa H, Tateno H, Yanagimachi R. 1999. Chromosome analysis of BALB/c mouse spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Biol Reprod* 61, 809-812.

Kiso WK, Asano A, Travis AJ, Schmitt DL, Brown JL, Pukazhenthi BS. 2012. Pretreatment of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa with cholesterol-loaded cyclodextrins and glycerol addition at 4° C improves cryosurvival. *Reprod Fert Develop* 24, 1134-1142.

Kjaestad H, Ropstad E, Berg KA. 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet Scand* 34, 299-303.

Konyali C, Tomás C, Blanch E, Gómez EA, Graham JK, Mocé E. 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* doi 10.1016/j.cryobiol.2013.06.001.

Krause W. 1995. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Int J Androl* 18, 32-35.

Kuehl RO. 2000. Diseño de experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones. 2ª ed. Ediciones Paraninfo, Madrid.

Langlais J, Roberts KD. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 12, 183-224.

Lardy HA, Phillips PH. 1939. Preservation of spermatozoa. *J Anim Sci* 1, 219-221.

Lauderdale J, Seguin B, Stellflug J, Chenault J, Thatcher W, Vincent C, Loyancano A. 1974. Fertility of cattle following PGF_{2a} injection. *J Anim Sci* 38, 964-967.

Le Guillou J, Ropers MH, Gaillard C, David-Briand E, Desherces S, Schmitt E, Bencharif D, Amirat-Briand L, Tainturier D, Anton M. 2013. Organization of lipids in the artificial outer membrane of bull spermatozoa reconstructed at the air-water interface. *Colloids Surf B Biointerfaces* Col Surf B. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.02.040.

Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. 1996. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 1, 1942-1946.

Leeuw A, Daas J, Woelders H. 1991. The fix vital stain method. *J Androl* 12, 112-118.

Lehrer A, Lewis G, Aizinbud E. 1992. Oestrus detection in cattle: recent developments. *Anim Reprod Sci* 28, 355-362.

Lemma A (ed). 2013. Success in artificial insemination. Quality of semen and diagnostics employed. InTeOP, Intechopen.com.

Lenz R, Kjelland M, Vonderhaar K, Swannack T, Moreno J. 2011. A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer. *J Anim Sci* 89, 383-388.

Lim JJ, Sung SY, Kim KS, Song SH, Lee WS, Yoon TK, Lee DR. 2008. Effect of cholesterol supplementation in freezing medium on the survival and integrity of human sperm after cryopreservation. *Korean J Reprod Med* 35, 203-212.

Liu Z, Foote R. 1998. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J Dairy Sci* 81, 1868-1873.

MacLeod J. 1970. The significance of deviations in human sperm morphology. In, Rosenberg E, Paulsen CA (eds), *The Human Testis*. Plenum Press, New York.

MacPherson J. 1960. Semen storage in liquid nitrogen. *Can Vet J* 1, 292-294.

Manjunath P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim Reprod* 9, 809-815.

Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. 2005. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 20, 3459-3468.

Martínez CO, Juárez-Mosquera MdeL, Hernández J, Valencia J. 2006. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear teca. *Theriogenology* 66, 1969-1975.

Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodríguez M, Alvarez M, Anel L, De Paz P. 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* 45, 67-78.

Maxwell WM. 1986. Artificial insemination of ewes with frozen thawed semen at a synchronized oestrus: II Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Anim Reprod Sci* 10:309-316.

Maxwell W, Johnson L. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Develop* 46, 408-418.

Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247, 125-142.

Medeiros C, Forell F, Oliveira A, Rodrigues J. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327-344.

Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJvW, Kruger TF, Van Zyl JA. 1990. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 5, 586-592.

Menon AG, Barkema HW, Wilde R, Kastelic JP, Thundathil JC. 2011. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Can J Vet Res* 75, 241-247.

Meyer RA, Barth AD. 2001. Effect of acrosomal defects on fertility of bulls used in artificial insemination and natural breeding. *Can Vet J* 42, 627-634.

Michajilov N. 1950. Sperm dilution in the milk. *The Czechoslovak Vet Mag Abstracts J Am Vet Med Assoc* 117, 337.

Milovanov, V.K. 1964 Artificial Insemination of Livestock in the U.S.S.R. Trans. by A. Birron and Z.S. Cole, S. Monson, Jerusalem; and Technical Services, U.S. Department of Commerce, Washington DC.

Mocé E, Graham JK. 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 84, 826-833.

Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK. 2010a. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Domestic Anim* 45, 57-66.

Mocé E, Purdy PH, Graham JK. 2010b. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci*, 118, 236-247.

Molinia F, Evans G, Maxwell W. 1994. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 42, 849-858.

Moore AI, Squires EL, Graham JK. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51, 241-249.

Moraes E, Graham JK, Torres C, Meyers M, Spizziri B. 2010. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 118, 148-154.

Morrell JM. 2011. Artificial Insemination: current and future trends. InTeOP, Intechopen.com.

Morris GJ, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. 2012. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology* 64, 71-80.

Mortimer ST. 2000. CASA-practical aspects. *J Androl* 21, 515-524.

Mortimer D, Menkveld R. 2001. Sperm morphology assessment. Historical perspectives and current opinions. *J Androl* 22, 192-205.

Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57, 1695-1706.

Muñoz R, Rivera M, Rigau T, Rodríguez-Gil J, Peña A. 2008a. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Anim Reprod Sci* 109, 50-64.

Muñoz R, Tamargo C, Hidalgo C, Peña A. 2008b. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci* 109, 27-39.

Muñoz R, Peña A, Rodríguez A, Tamargo C, Hidalgo C. 2009. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology* 72, 860-868.

Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. 2004. Annexin V binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl* 25, 797-810.

Nagao Y, Ohta Y, Murakami H, Kato Y. 2010. The effects of methyl- β -cyclodextrin on in vitro fertilization and the subsequent development of bovine oocytes. *Zygote* 18, 323-330.

Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod* 68, 1828-1835.

Nolan JP, Graham JK, Hammerstedt RH. 1992. Artificial induction of exocytosis in bull sperm. *Arch Biochem Biophys* 292, 311-322.

Ochsendorf F. 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod* 5, 399-420.

Okazaki T, Shimada M. 2012. New strategies of boar sperm cryopreservation: Development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Anim Sci J* 83, 623-629.

Oliveira C, Vasconcelos A, Souza F, Martins-Filho O, Silva M, Varago F, Lagares M. 2010. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 118, 194-200.

Parinaud J, Vieitez G, Vieu C, Collet X, Perret B. 2000. Enhancement of zona binding using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Hum Reprod* 15, 1117-1120.

Parkinson TJ, Whitfield CH. 1987. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology* 27, 781-797.

Parks JE. 1997. Hypothermia and mammalian gametes In, Karow AM, Critser JK (eds). *Reproductive tissue banking*. Academic Press, San Diego, USA, pp 229-261.

Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209-222.

Parks JE, Meachan TN, Saacke RG. 1981. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids, and viability at 4°C and 37°C. *Biol Reprod* 24, 399-404.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Graham JK. 1999. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology* 51, 461-472.

Pereira R, Tuli R, Wallenhorst S, Holtz W. 2000. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A 23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology* 54, 185-192.

Pérez LJ, Valcárcel A, de las Heras MA, Moses D, Baldassarre. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46, 131-140.

Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey JL. 2004. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl* 25, 224-233.

Petrunkina AM, Waberski D, Gunzel-Apel AR, Topfer- Petersen E. 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 134, 3-17.

Petrunkina A, Harrison R. 2011. Cytometric solutions in veterinary andrology: Developments, advantages, and limitations. *Cytom Part A* 79, 338-348.

Phillips PH, Lardy HA. 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull sperm. *J Dairy Sci* 23, 399-404.

Polge C. 1951. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79° C. *Nature* 167, 949-950.

Polge C, Rowson L. 1952. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79° C. *Nature* 169, 626-627.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666.

Potts R, Newbury C, Smith G, Notarianni L, Jefferies T. 1999. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 423, 103-111.

Purdy H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum Res* 6, 215-225. Citado por barbas

Purdy PH, Graham JK. 2004a. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol Reprod* 71, 522-527.

Purdy PH, Graham JK. 2004b. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48, 36-45.

Pursley J, Mee M, Wiltbank M. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. *Theriogenology* 44, 915-923.

Pursley J, Kosorok MR., Wiltbank MC. 1997. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci* 80, 301-306.

Rodríguez-Gil JE, Estrada E. 2013. Artificial insemination in boar reproduction. In: Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M (eds). *Boar Reproduction. Fundamentals and new biotechnological trends*. Springer Verlag, Berlin, pp. 589-607.

Rodríguez-Martínez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim* 38, 312-318.

Rodriguez-Martinez H. 2012. Assisted reproductive techniques for cattle breeding in developing countries: A critical appraisal of their value and limitations. *Reprod Domest Anim* 47, 21-26.

Rosato MP, Iaffaldano N. 2012. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* 79, 508-516.

Saacke RG. 1983. Semen quality in relation to semen preservation. *J Dairy Sci* 66, 2635-2644.

Saacke RG. 2008. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 70, 473-478.

Sakkas D, Alvarez . 2010. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93, 1027-1036.

Salamon S, Maxwell W. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62, 77-111.

Salazar I. 2013. Embriología veterinaria. Universidad de Santiago Compostela, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Santiago de Compostela.

Salisbury G, Fuller H, Willett E. 1941. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluents and field results from its use. *J Dairy Sci* 24, 905-910.

Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR. 1978. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. 2nd ed. W. H. Freeman Co., San Francisco.

Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas J, Isachenko V, Kreinberg R, Isachenko E. 2011. Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia* 43, 233-241.

Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas J, Isachenko V, Isachenko E. 2012. Vitrified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at - 86° C. *Andrologia* 44, 433-435.

Sariözkan S, Tuncer PB, Bucak MN, Ulutaş PA. 2009. Influence of various antioxidants on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen. *Acta Vet Brno* 78, 463-469.

Satirapod C, Treetampinich C, Weerakiet S, Wongkularb A, Rattanasiri S, Choktanasiri W. 2012. Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity. *Andrologia* 44, 786-790.

Schenk JL, Suh TK, Cran DG, Seidel GE Jr. 1999. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52, 1375-1391.

Senger PL, Becker WC, Hillers JK. 1976. Effect of thawing rate and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. *J Anim Sci* 42, 932-936.

Serin İ, Aksoy M, Ceylan A. 2011. Cholesterol-loaded cyclodextrin inhibits premature acrosomal reactions in liquid-stored rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 123, 106-111.

Shannon P, Vishwanath R. 1995. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim Reprod Sci* 39, 1-10.

Sikka, S.C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1, 78-86.

Silva B, Moraes E, Oliveira C, Junior WF, Matos W, Graham JK, Lima L. 2012. Addition of cholesterol in fresh goat sperm improves cryosurvival rates. *Reprod Fert Develop* 25, 186-186.

Singer SJ, Nicolson GL. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.

Singh M, Sharma R, Banerjee U. 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv* 20, 341-359.

Sinha M, Sinha A, Singh B, Prasad R. 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim Reprod Sci*, 41, 237-243.

Smith AU, Polge C. 1950. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Vet Rec* 62, 115-116.

Söderquist L, Janson L, Larsson K, Einarsson S. 1991. Sperm morphology and fertility in AI bulls. *J Vet Med SerA* 38, 534-543.

Sørensen E. 1940. Insemination with gelatinized semen in paraffined cellophane tubes. *J Dairy Sci* 23, 399-404.

Spallanzani, L. 1784. Dissertations relative to the natural history of animals and vegetables. Trans. by T. Beddoes. In *Dissertations Relative to the Natural History of Animals and Vegetables*, Vol. 2. Murray, London, pp. 195-199.

Spizziri B, Fox M, Bruemmer J, Squires E, Graham JK. 2010. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 118, 255-264.

Stevenson J, Britt J. 1977. Detection of estrus by three methods. *J Dairy Sci* 60, 1994-1998.

Stevenson JS, Pursley JR. 1994. Use of milk progesterone and prostaglandin F2a in a scheduled artificial insemination program. *J Dairy Sci* 77, 1755-1760.

Swanson EW, Bearden H. 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J Anim Sci* 10, 981-987.

Talbot P, Summers R, Hylander B, Keough E, Franklin L. 1976. The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187. *J Exp Zool* 198, 383-392.

Taşdemir U, Büyükleblebici S, Tuncer PB, Coşkun E, Özgürtaş T, Aydın FN, Büyükleblebici O, Gürçan İS. 2012. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology* 66, 38-42.

Thacker D, Almquist J. 1953. Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. *J Dairy Sci* 36, 173-180.

Thibier M. 2005. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev* 45, 235-242.

Thibier M, Wagner HG. 2002. World statistics for artificial insemination in cattle. *Livest Prod Sci* 74, 203-212.

Thomas CA, Garner DL, Dejarnette JM, Marshall CE. 1997. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 56, 991-998.

Thundathil J, Palasz A, Barth A, Mapletoft R. 1998. Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Mol Reprod Dev* 50, 328-333.

Thundathil J, Palasz A, Mapletoft R, Barth A. 1999. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 57, 35-50.

Thundathil J, Meyer R, Palasz A, Barth A, Mapletoft R. 2000. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology* 54, 921-934.

Thundathil J, Palomino J, Barth A, Mapletoft R, Barros C. 2001. Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented acrosomes. *Anim Reprod Sci* 67, 231-243.

Tomás C, Blanch E, Fazeli A, Mocé E. 2012. Effect of a pre-freezing treatment with cholesterol-loaded cyclodextrins on boar sperm longevity, capacitation dynamics, ability to adhere to porcine oviductal epithelial cells in vitro and DNA fragmentation dynamics. *Reprod Fert Develop* 25, 935-946.

Tomás C, Blanch E, Cebrián B, Mocé E. 2013. In vivo fertilising ability of frozen-thawed boar sperm treated with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci* doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.05.007.

Tuncer PB, Bucak MN, Büyükleblebici S, Sariözkan S, Yeni D, Eken A, Akalin PP, Kinet H, Avdatek F, and Fidan AF. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology* 61, 303-307.

Uysal O, Bucak M, Yavas I, Varisli O. 2007. Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *J Anim Vet Adv* 6, 1362-1366.

Van Loon A, Sonneveld E, Hoogerbrugge J, Van Der Schans G, Grootegoed J, Lohman P, Baan R. 1993. Induction and repair of DNA single-strand breaks and DNA base damage at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster upon in vitro exposure to ionizing radiation. *Mutat Res-DNA Repair*, 294, 139-148.

Van Wagendonk-De Leeuw A, Haring R, Kaal-Lansbergen L, Den Daas J. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* 54, 57-67.

Verma O, Kumar R, Kumar A, Chand S. 2012. Assisted reproductive techniques in farm animal. From artificial insemination to nanobiotechnology. *Vet World* 5, 301-310.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.

Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning XP, Fornes M, Kopf GS. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 19, 242-248.

Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning XP, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. *J Biol Chem* 274, 3235-3242.

Vishwanath R. 2003. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 59, 571-584.

Walton A. 1927. The relation between "density" of sperm-suspension and fertility as determined by artificial insemination of rabbits. *Proc R Soc London* 101, 303-315.

Ward CR, Storey BT. 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 104, 287-296.

Watson PF. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In, Morris GJ, Clarke A (eds). *Effects of low temperatures on biological membranes*. Academic Press London, pp. 189-218.

Watson PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In, Lamming GE (ed). *Marshall's physiology of reproduction*. Vol 2, 4th edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 747-869.

Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Develop* 7, 871-891.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60 481-492.

Way A, Henault M, Killian G. 1995. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology* 43, 1301-1316.

Wheeler MB, Seidel GEJ. 1986. Time course of in vitro capacitation of frozen and unfrozen bovine spermatozoa *Theriogenology* 25, 216.

White I. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fert Develop* 5, 639-658.

Whitfield C, Parkinson T. 1995. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology* 44, 413-422.

Woelders H. 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet Quart* 19, 135-138.

Zahn F, Papa F, Dell'Aqua J. 2002. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology* 58, 237-240.

Zeng WX, Terada T. 2001a. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. *J Androl* 22, 111-118.

Zeng WX, Terada T. 2001b. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology* 55, 615-627.

Zidovetzki R, Levitan I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content. Evidence, misconceptions and control strategies. *BBA* 1768, 1311-1324.

Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. 2001. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology* 58, 258-261.





7. ICONOGRAFÍA



Figura 1. Vista aérea de Xenética Fontao (foto superior) y localización de las instalaciones (foto inferior): 01 Entrada; 02 Entrada principal; 03 Laboratorio de análisis de semen; 04 Laboratorio envasado y criopreservación de semen; 05 Banco de semen; 06 Laboratorio de fecundación *in vitro*; 07, 08 y 09 Laboratorios de genética molecular; 10 Área central de acceso a naves; 11 Área de acceso a naves; 12 Interior nave 2.



Figura 1. Microscopios Zeiss y Olympus utilizados para el análisis de semen.



Figura 2. Fotómetro Accucell



Figura 3. Máquina de envasado e impresión IS3 en cabina de refrigeración.

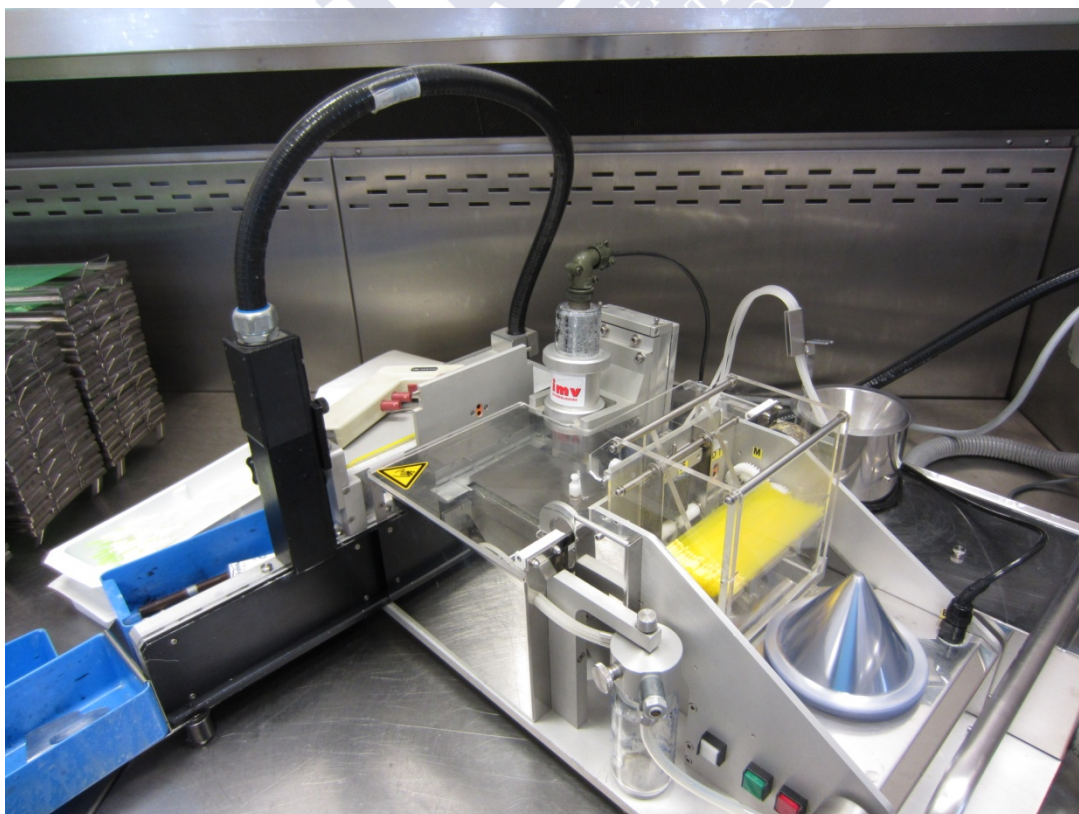


Figura 4. Detalle de la máquina de envasado y congelación IS3.



Figura 5. Equipo de congelación: bombona de nitrógeno líquido (izquierda) y arcón congelador (derecha).



Figura 6. Citómetro de flujo Facs Calibur.

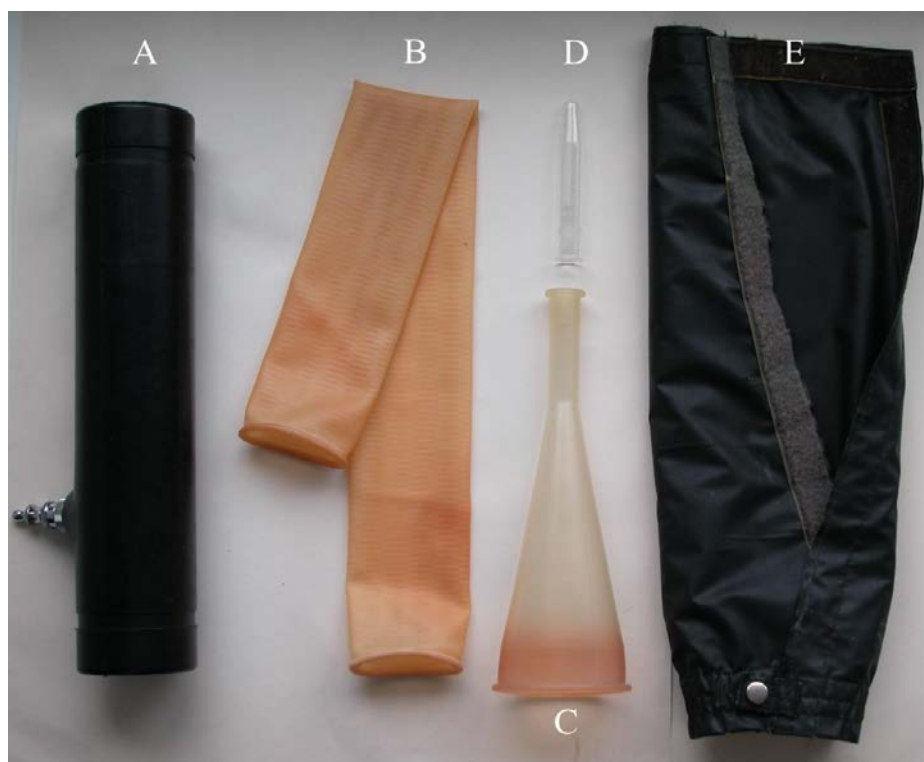


Figura 7. Vagina artificial: cilindro de caucho (A), camisa (B), cono (C), colector (D) y funda (E).

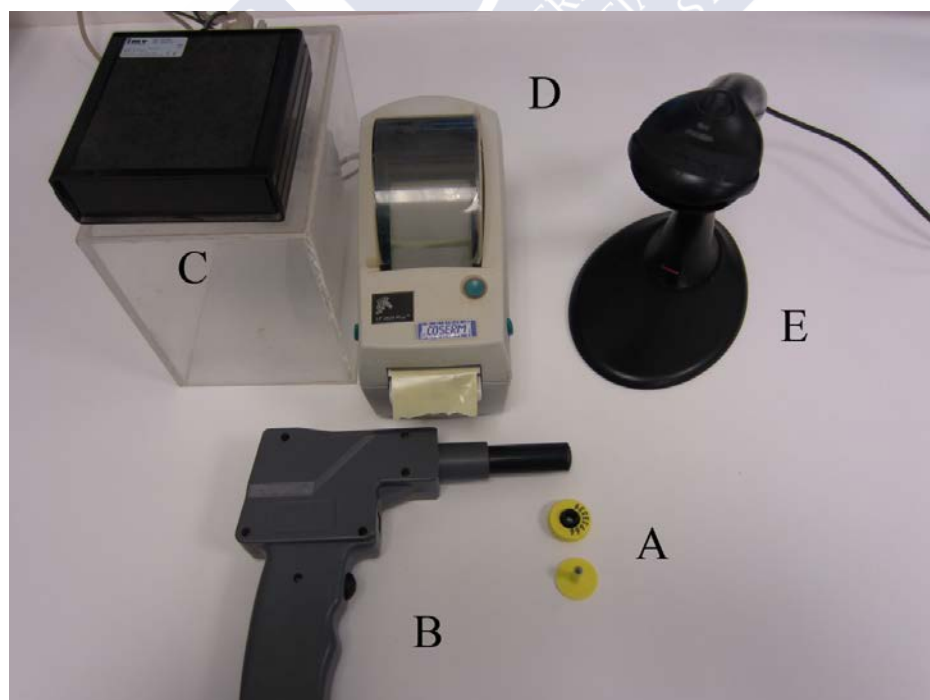


Figura 8. Sistema de trazabilidad: chip electrónico (A), pistola detectora (B), receptor (C), impresora (D), lector de código de barras (E).

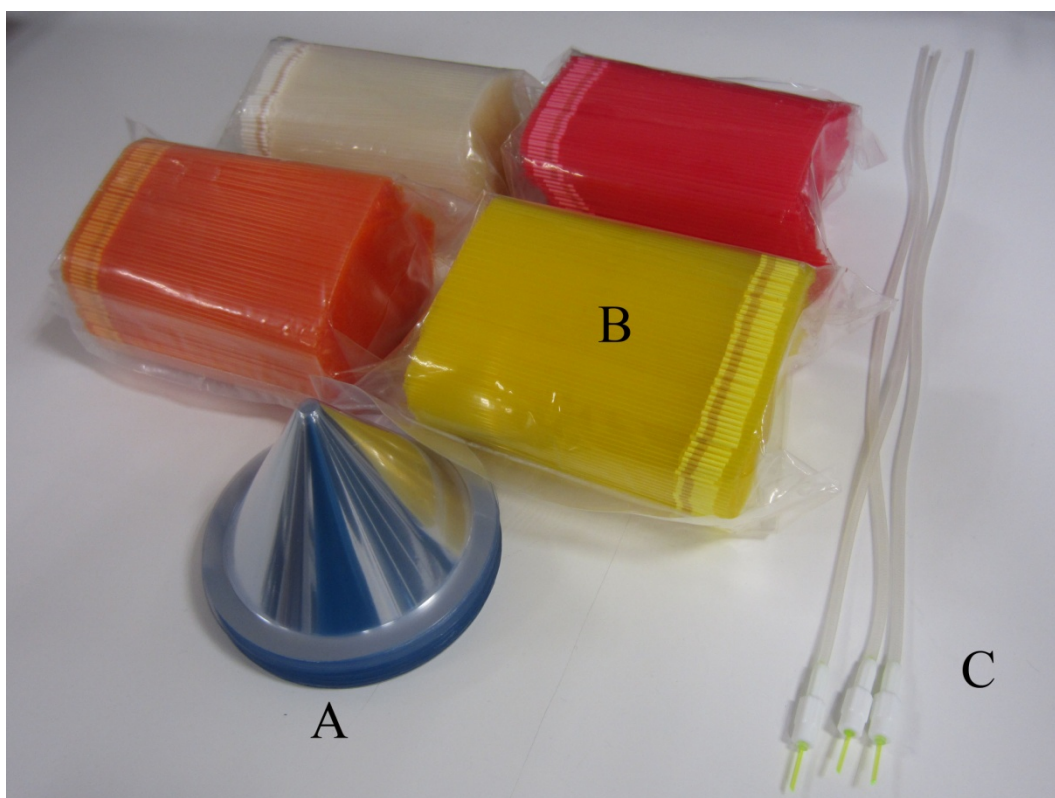


Figura 9. Material de envasado: embudos (A), pajuelas (B), conectores (C).



Figura 10. Tanques criogénicos.



Figura 11. Extracción de semen.

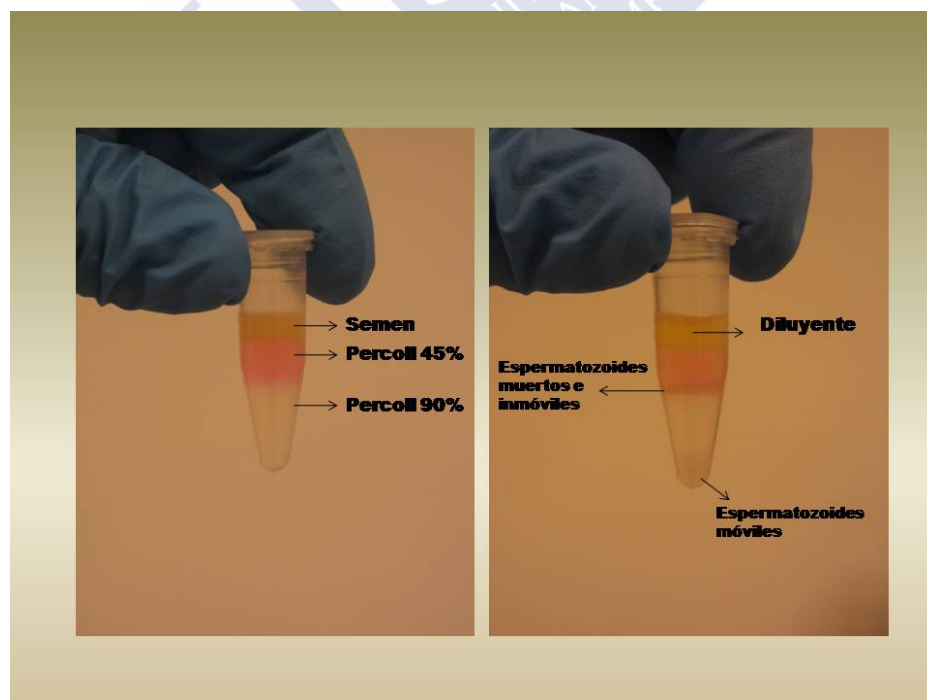


Figura 12. Soluciones Percoll con semen antes (izquierda) y después (derecha) de la centrifugación.

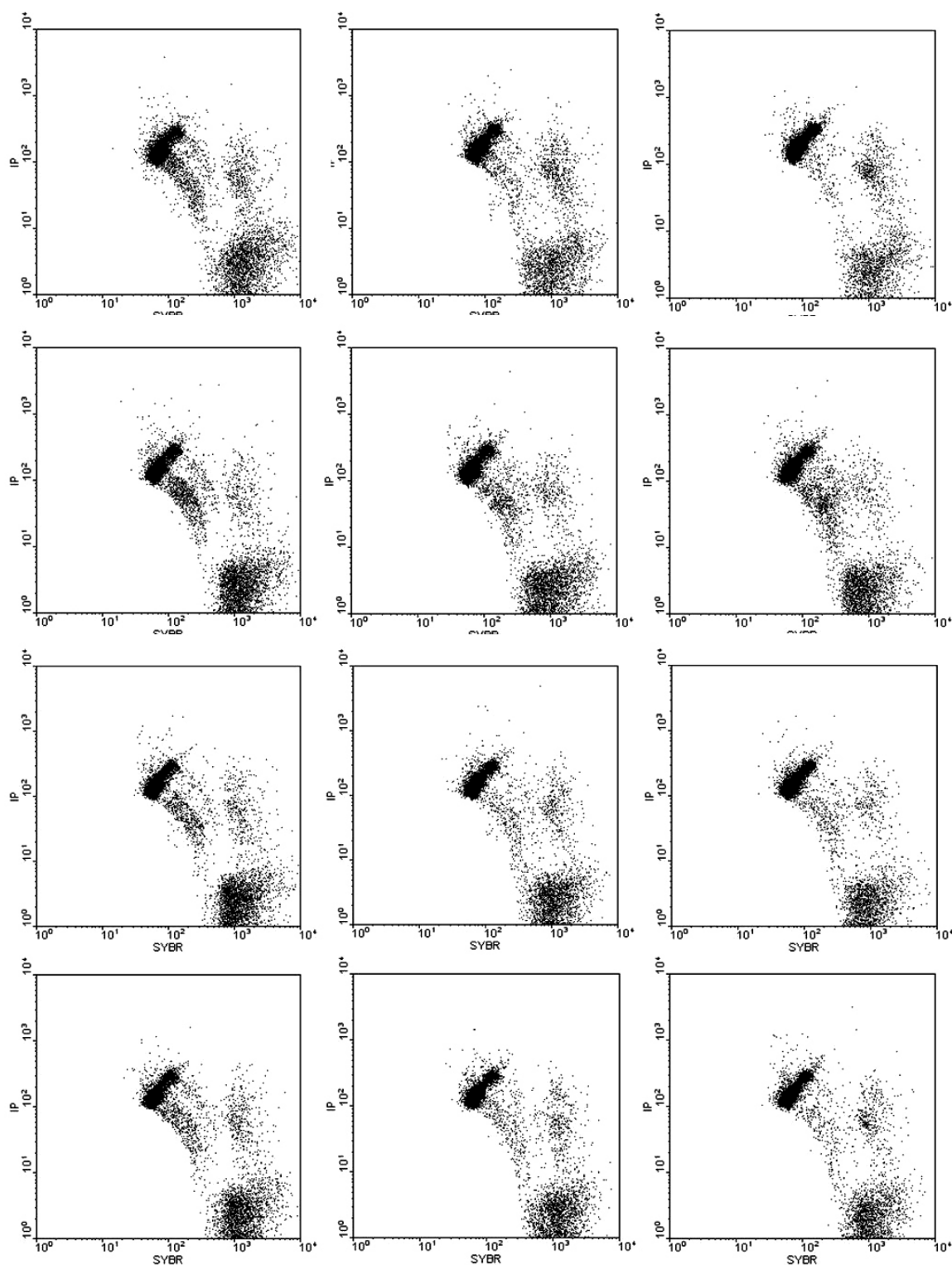


Figura 14. Citogramas correspondientes al análisis de la viabilidad. En cada esquema, la nube central más densa incluye la población de espermatozoides muertos y la nube del ángulo inferior derecho la población de espermatozoides vivos. Las filas se relacionan con los distintos tratamientos (de arriba abajo, 1, 2, 3 y 4) y las columnas a los tiempos (de izquierda a derecha, 0', 60' y 120').

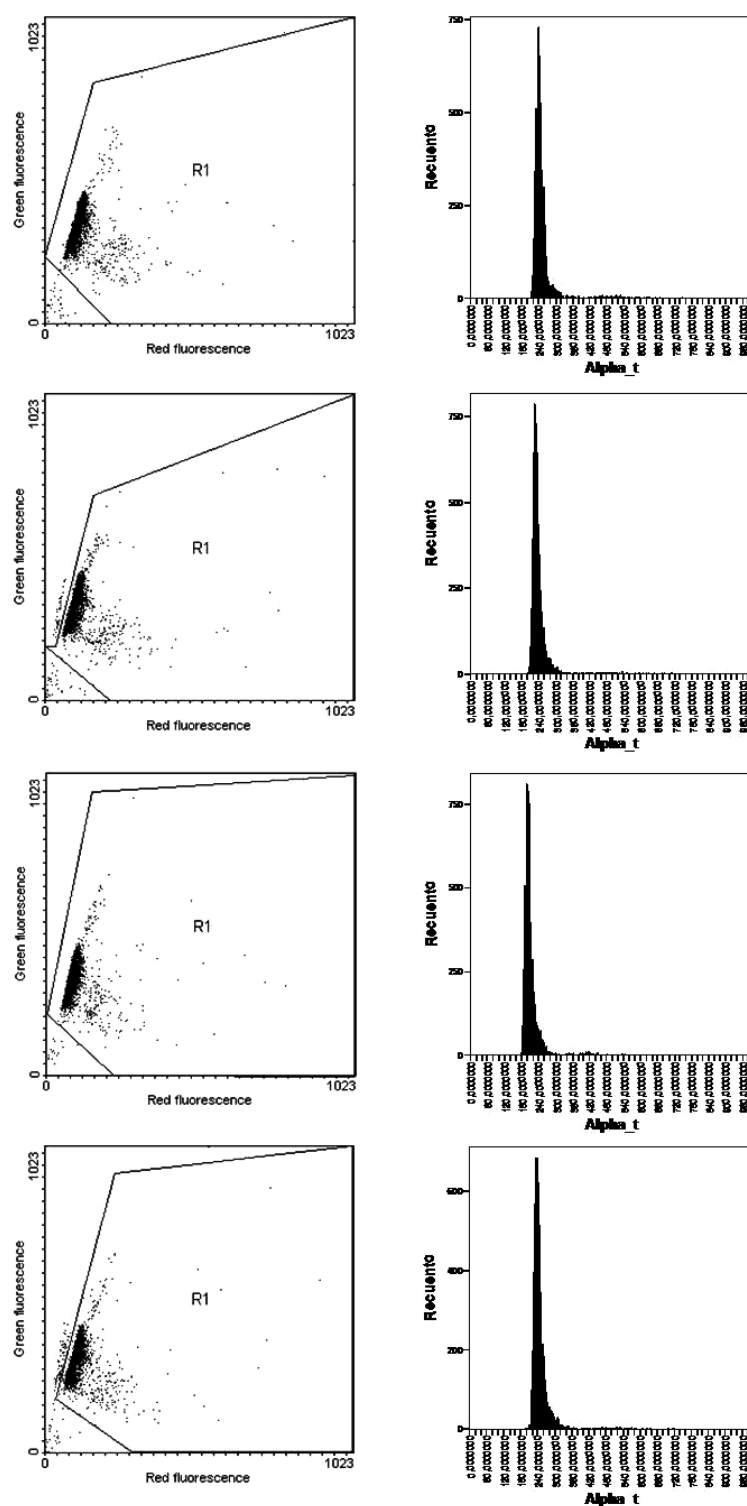


Figura 15. Citogramas (izquierda) e histogramas (derecha) correspondientes al análisis de la fragmentación de la cromatina (SCSA). Las filas se relacionan con los distintos tratamientos (de arriba abajo, 1, 2, 3 y 4).

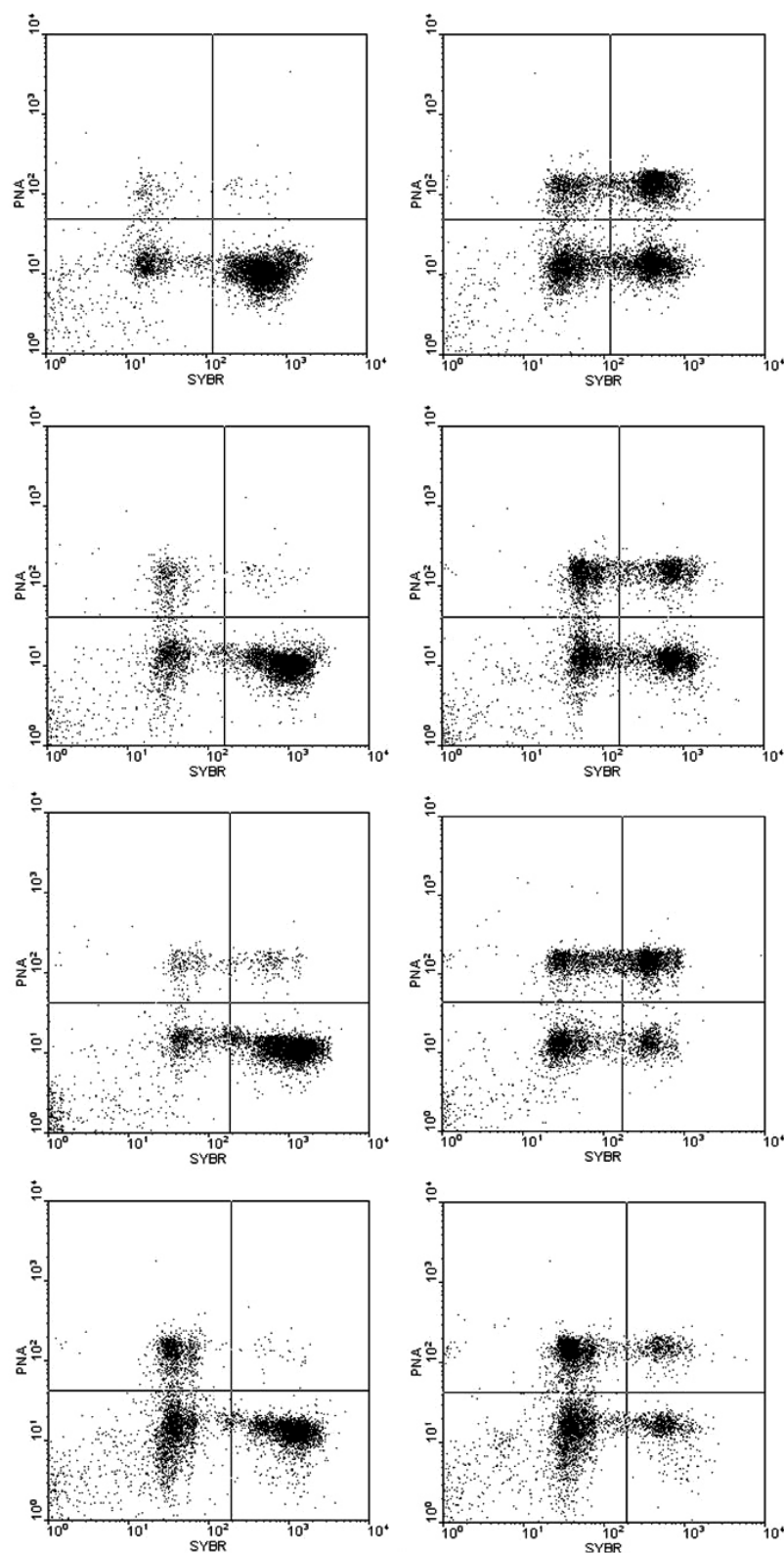


Figura 16. Citogramas correspondientes al análisis de la reacción acrosómica, sin inducir (izquierda) y después de la inducción con ionóforo de calcio (derecha). Las filas se relacionan con los distintos tratamientos (de arriba abajo, 1, 2, 3 y 4).

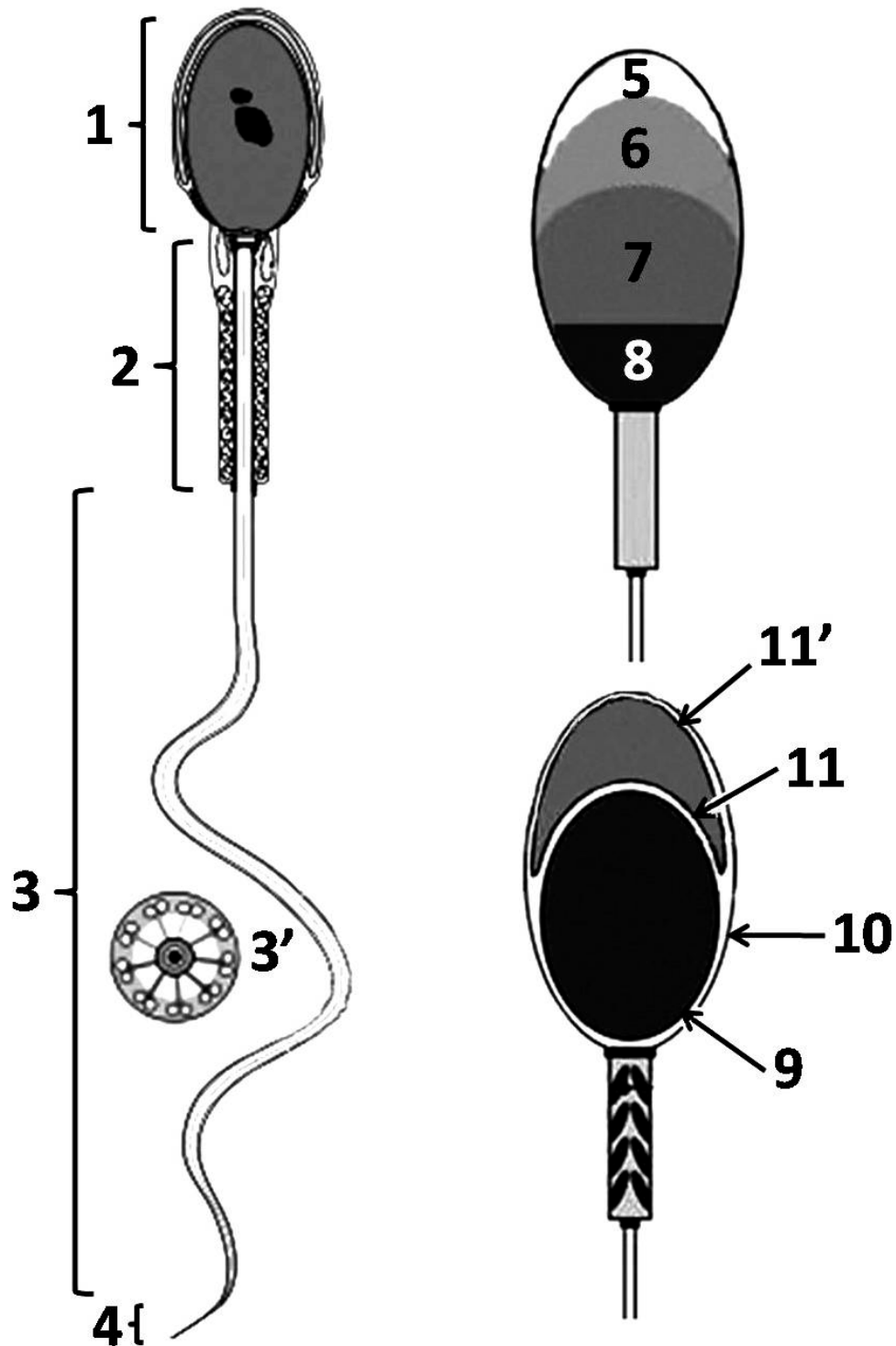


Figura 17. Representación esquemática de un espermatozoide (izquierda) y detalles de su cabeza (derecha). 1, cabeza; 2, pieza intermedia; 3, cola; 4, pieza terminal; 5, parte apical; 6, parte pre-ecuatorial; 7, parte ecuatorial; 8, parte post-ecuatorial; 9, membrana nuclear; 10, membrana plasmática; 11, membrana del acrosoma, parte interna; 11', membrana del acrosoma, parte externa.

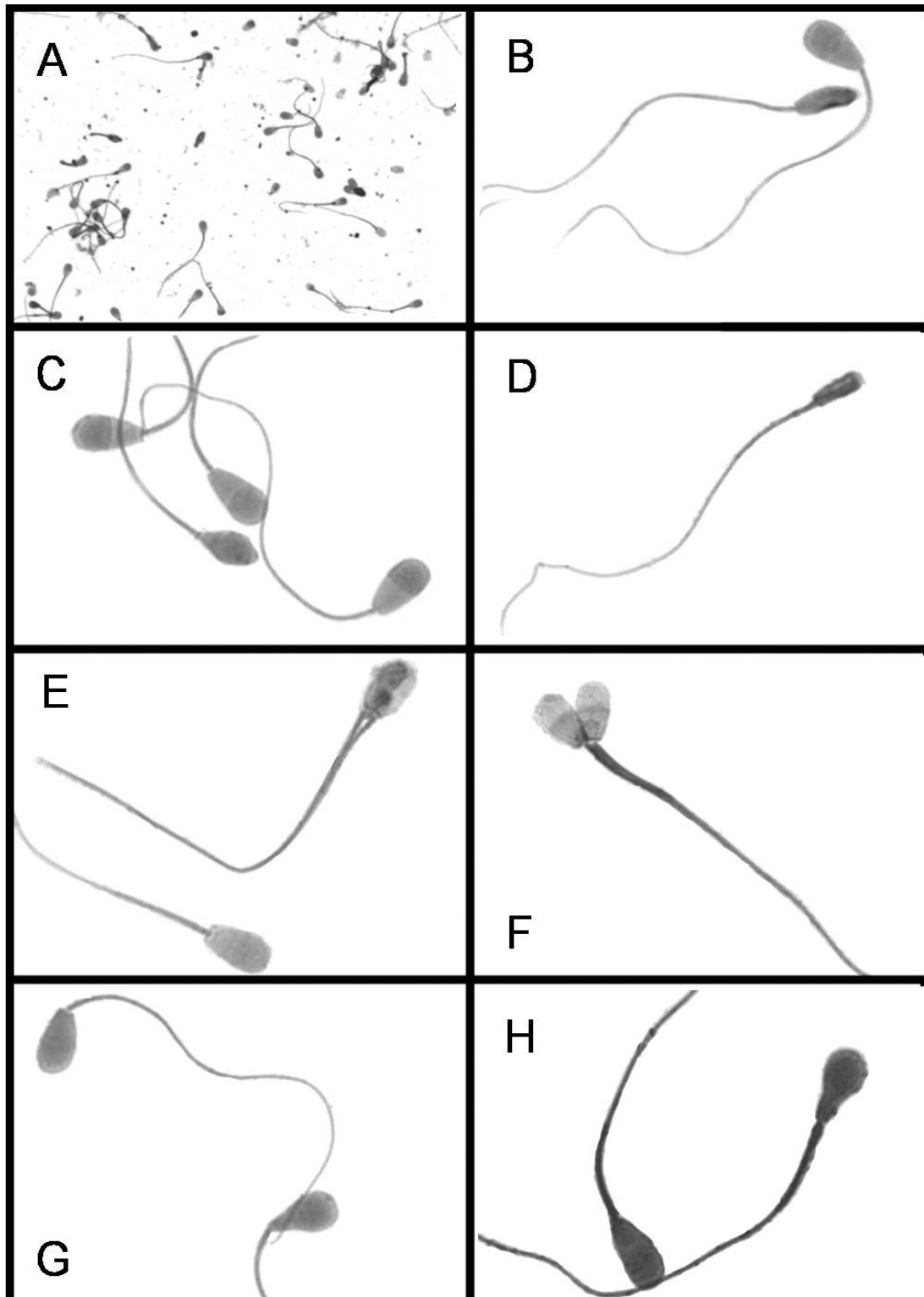


Figura 18. Anormalidades más frecuentes de los espermatozoides. Vista general (A); diferentes imágenes relativas a la variedad de cabeza subdesarrollada (B, C, D); diferentes imágenes relativas a la variedad de cabeza doble (E, F); diferentes imágenes relativas a la variedad de cabeza piriforme (G, H).

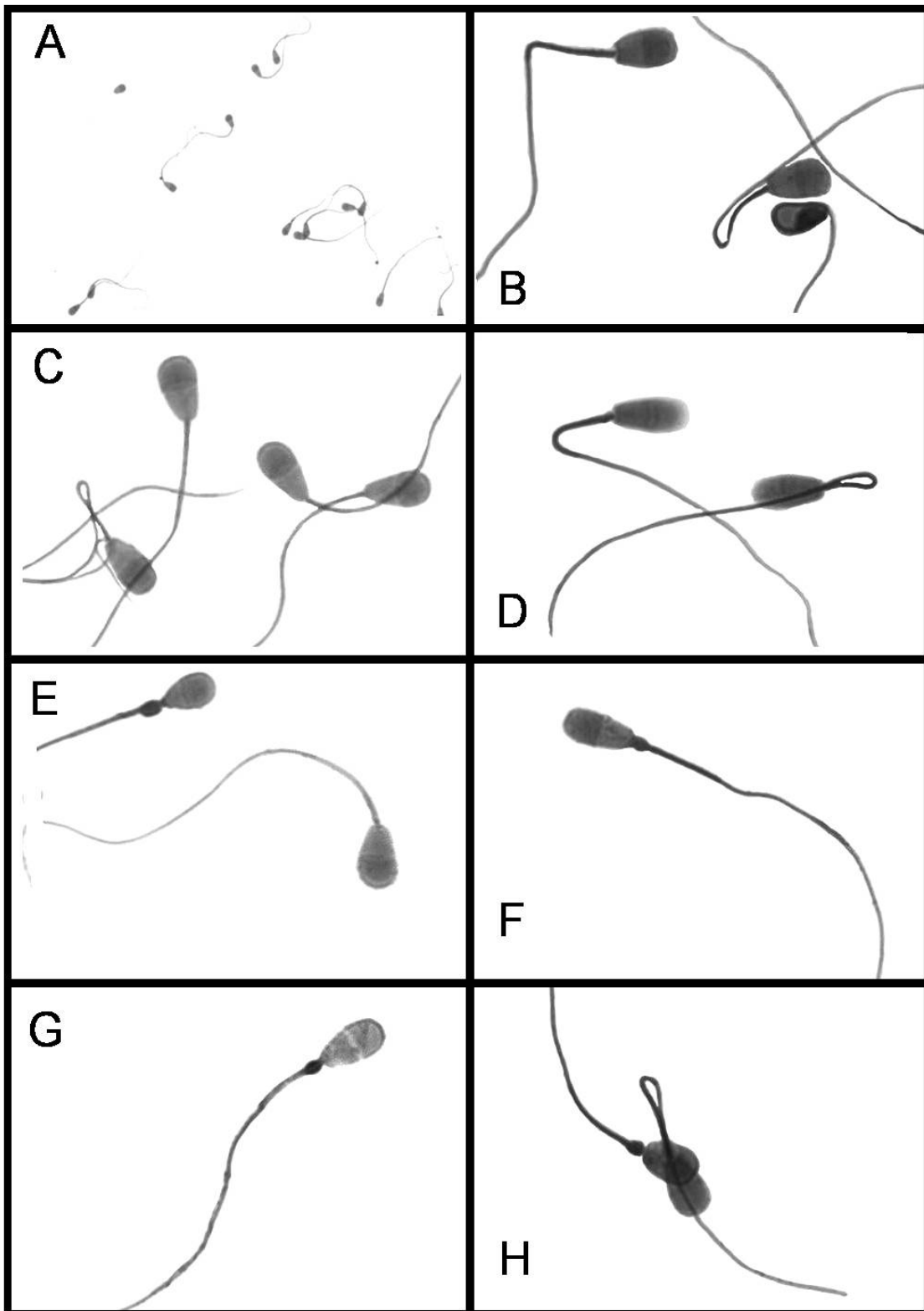


Figura 19. Anormalidades más frecuentes de los espermatozoides. Vista general (A); diferentes imágenes relativas a la variedad de plegamiento proximal o de la pieza intermedia (B, C, D); diferentes imágenes relativas a la variedad de gota proximal (E, F, G); gota proximal y plegamiento pieza intermedia (H).

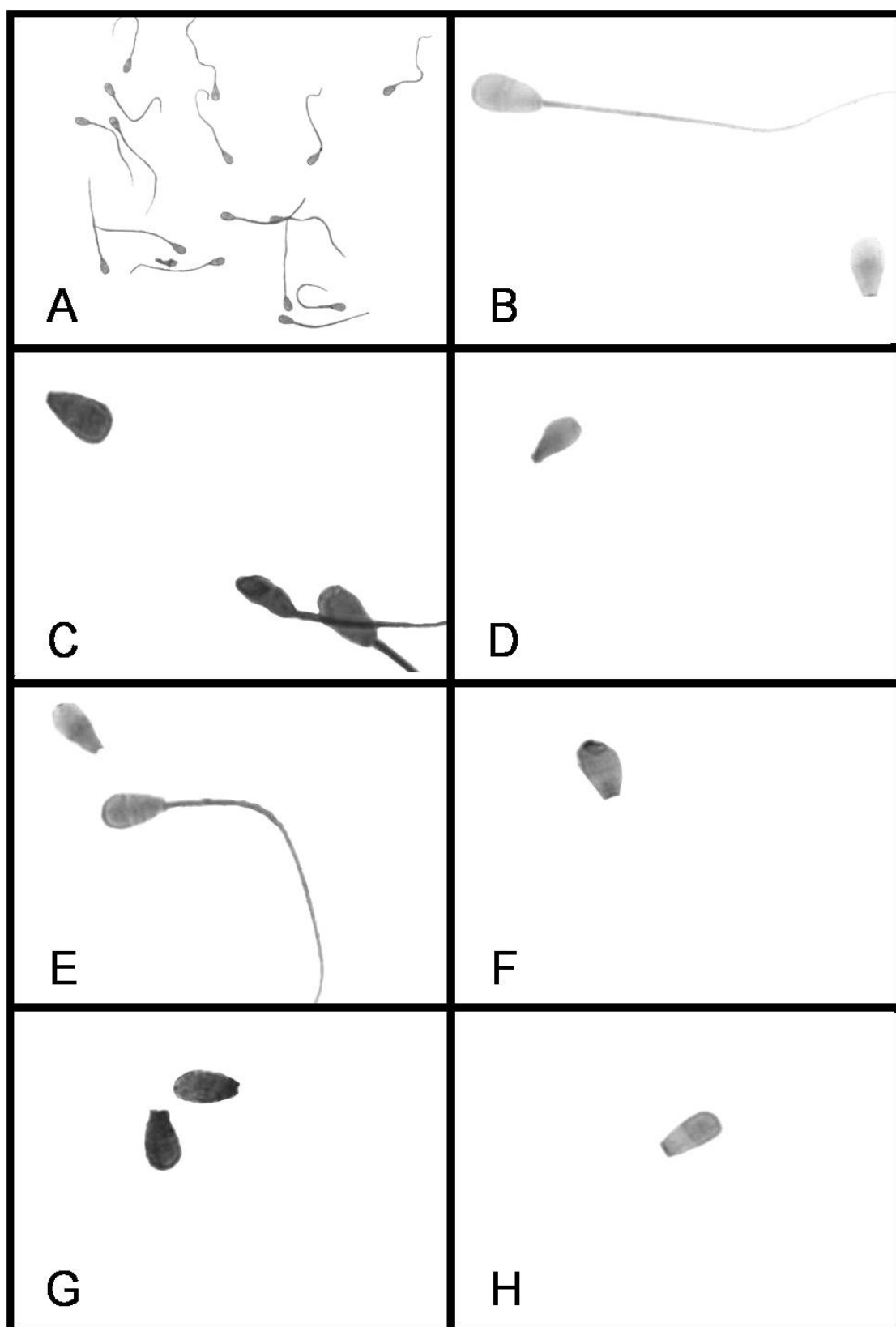


Figura 20. Anormalidades más frecuentes de los espermatozoides. Vista general (A); diferentes imágenes relativas a la variedad de cabeza suelta (B-H).

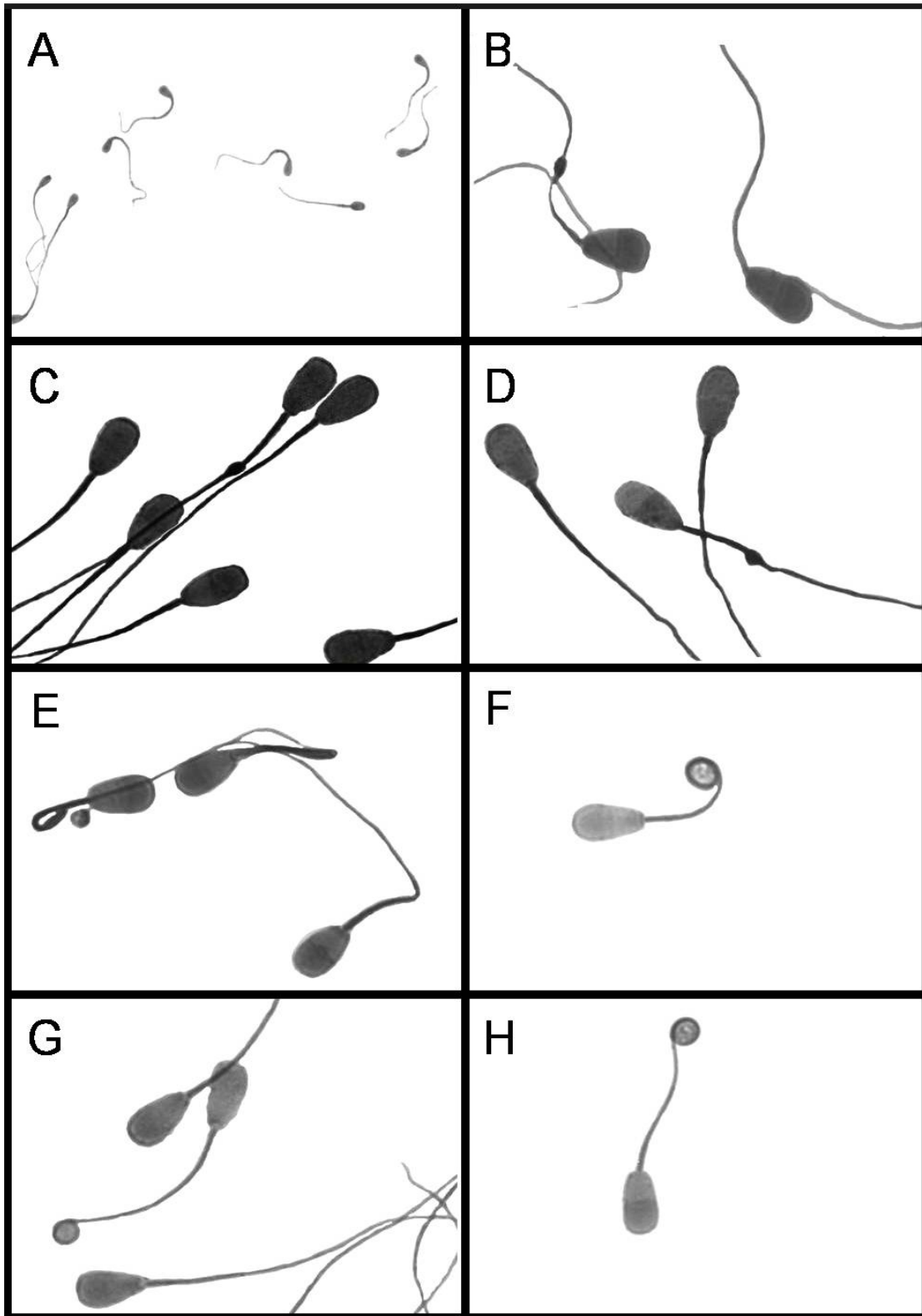


Figura 21. Anormalidades más frecuentes de los espermatozoides. Vista general (A); diferentes imágenes relativas a la variedad de gota distal (B, C, D); diferentes imágenes relativas a la variedad de cola plegada (E, F, G, H).